

**ESTUDO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM ADENOCARCINOMAS SEROSOS DE
OVÁRIO DE PACIENTES RESPONSIVAS OU NÃO À
QUIMIOTERAPIA**

MARIANA REZENDE ALVES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutorado em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

Co-Orientadora: Dra. Louise de Brot Andrade

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Alves, Mariana Rezende

Estudo de genes diferencialmente expressos em adenocarcinomas serosos de ovário de pacientes responsivas ou não à quimioterapia / Mariana Rezende Alves – São Paulo, 2017.

122p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. Neoplasias Ovarianas/Ovarian Neoplasms/. 2. Cistadenocarcinoma Seroso/genética/ Cystadenocarcinoma, Serous/genetic. 3. Quimioterapia/Drug Therapy. 4. Expressão Gênica/Gene Expression. 5. Prognóstico/Prognosis.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pacientes que enfrentaram o câncer e indubitavelmente contribuíram para a conclusão desta tese. A luta que traçaram junto aos seus familiares nos permitiu agregar conhecimento à comunidade científica e fortalecer a luta contra o câncer.

Dedico também à minha família que representa a minha força para lidar com os desafios que se apresentam neste caminho do qual ainda há muito por trilhar.

‘Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota’. (Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido à bênção de viver mais um desafio.

As pacientes que contribuíram assinando o termo de consentimento desse trabalho.

Ao meu orientador Dr. Rafael Malagoli Rocha pelas oportunidades e confiança durante esses 6 anos de pesquisa. Por abrir meus horizontes e me capacitar como pesquisadora.

Ao Departamento de Patologia Investigativa, em especial a Dra. Louise de Brot pelas longas tardes de revisões de laminas nas quais pude aprender um pouco mais sobre patologia.

Ao Departamento de Oncologia Clínica pela colaboração nesse projeto. A Dra. Solange Sanches por nos introduzir o conhecimento sobre a doença estudada de forma tão atenciosa e ao Dr. Alexandre da Costa pela disponibilidade e contribuição ao longo desses 4 anos para o desenvolvimento do estudo.

Ao departamento de ginecologia, em especial ao Dr. Glauco Baiocchi.

Ao departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da USP em especial a Professora Kátia Carvalho.

Aos funcionários da pós-graduação e biblioteca.

Aos amigos que fiz durante esses anos no A.C.Camargo, que de certa forma caminharão comigo até o final: Nayra Soares, Felipe Ilelis, Natalia Melo, Fernanda Carvalho, André Lavorato, Mayara Botelho e Beatriz Nunes.

A minha família, principalmente a minha mãe por todo o amor e por todas as conquistas que alcancei com seu apoio. A família aqui comigo em São Paulo: Irmãos Denise e Augusto e a pequena Maísa, que me mostra o significado do amor a todo o momento, principalmente quando, com aquela voz tão doce, me chama de Tia Mariana.

Aos amigos Pedro Seixas e Tiago da Costa, irmãos que a vida me deu.

Aos Amigos que fiz na Inglaterra: Keith Miler por toda a hospitalidade desde o minuto em que pisei na Inglaterra. Dra Sarah Wedden pelo carinho, companhia e ensinamentos (dentro e fora do laboratório). Dr Corrado D'Arigo por todo carinho, paciência e supervisão durante o Doutorado Sanduiche em *Poundbury Cancer Institute*. Ao amigo mais especial, Thomas Roegele que meu deu todo o suporte emocional nesse período longe da família e amigos, e atualmente, ensinando a arte do companheirismo mesmo a 9 mil km de distância.

RESUMO

Alves MR. **Estudo de genes diferencialmente expressos em adenocarcinomas serosos de ovário de pacientes responsivas ou não à quimioterapia.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de ovário representa 5% das mortes por câncer entre as mulheres na faixa etária de 40 a 60 anos, causando mais mortes do que qualquer outro câncer ginecológico. O câncer de ovário do tipo epitelial é mais frequente, dentre os quais se destacam os adenocarcinomas serosos de alto grau, com taxas substanciais de instabilidade genômica e proliferação celular. Embora as pacientes com esse subtipo histológico sejam sensíveis ao tratamento de quimioterapia uma considerável parcela dessas pacientes irá recidivar após a primeira linha de tratamento. Devido ao alto risco de recorrência do adenocarcinoma seroso de alto grau o estudo molecular de marcadores prognósticos podem ser valiosos para a estratificação da paciente, dessa forma o atual estudo propôs identificar marcadores moleculares que possam estar envolvidos no adenocarcinoma seroso de alto grau, através da análise de expressão gênica em larga escala comparando grupo de mulheres respondedoras ou não respondedoras a quimioterapia e, assim, determinar melhores e mais acurados marcadores prognósticos e preditivos de resposta à quimioterapia neste subtipo tumoral. As amostras para esse estudo foram fielmente selecionadas para avaliação de expressão gênica em larga escala referentes, no momento do diagnóstico, aos seguintes critérios: cirurgia primária ótima, estadiamento FIGO III, mesmo subtipo e grau histológico; porém com diferentes desfechos clínicos em dois anos de acompanhamento: pacientes sem recorrência da doença após 2 anos do último tratamento com platina, considerados como "respondedoras" e pacientes com recorrência dentro de 2 anos a partir da última infusão de platina, considerado como "não respondedoras". Os genes selecionados foram submetidos a validação por qRT-PCR e avaliados quanto ao nível proteico em uma coorte de 114 pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau usando plataforma automatizada Ventana Benchmark. A positividade para a imuno-histoquímica (IHQ) foi correlacionada com

dados clínico a anatomopatológicos. Identificamos 1149 genes que foram diferencialmente expressos em dados de *microarray*, de acordo com o desfecho das pacientes. Análise de qRT-PCR validou a expressão de *MMP14* e *PTGDS* nas mesmas amostras ($r = 0,625$ e $r = 0,945$). A análise de IHQ mostrou que a positividade para PGD2 foi fortemente associada ao aumento da sobrevida livre de doença ($p = 0,009$), ausência de recidiva ($p = 0,026$) e sensibilidade à terapia com platina ($p = 0,040$). A regressão múltipla de Cox mostrou que a avaliação de PGD2 por IHQ também foi um marcador prognóstico relacionado à recaída (HR: 0,37; $p = 0,002$), enquanto MMP14 não apresentou valores de expressão correlacionados ao prognóstico. A avaliação por IHQ de PGD2 mostra um marcador independente de bom prognóstico, contribuindo para a compreensão de um mecanismo de regulação tumoral e investigação sobre biomarcador que prevê resposta à quimioterapia.

SUMMARY

Alves MR. **[Differentially expressed genes in high grade ovarian serous adenocarcinoma of responsive and non-responsive patients to chemotherapy]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Ovarian cancer accounts for 5% of cancer deaths among women, causing more deaths than any other gynecological cancer. Epithelial ovarian cancer is the more frequent subtype, highlighting high grade serous adenocarcinoma with substantial rates of genomic instability and cell proliferation. In order to minimize the interference in the outcome of ovarian cancer patients, the present study proposed to identify biomarkers that could predict response to conventional chemotherapy at the time of diagnosis of high grade serous ovarian adenocarcinoma. The samples for this study were faithfully selected for gene expression evaluation, following the criteria of: optimal surgery, FIGO III staging, the same histological pathological grade. These patients just had a different outcome, that was recurrence of the disease after 2 years of the last platinum treatment, considered as "responders", and patients with no recurrence within 2 years of the last infusion of platinum, considered as "non-responders". The selected genes were submitted to qRT-PCR validation and evaluated for protein level in a cohort of 114 patients with high-grade serous adenocarcinoma using Ventana Benchmark platform. Immunohistochemistry (IHC) positivity was correlated with clinical and anatomopathological data. We identified 1149 genes that were differentially expressed in microarray data, according to the outcome of the patients. Analysis of qRT-PCR validated the expression of *MMP14* and *PTGDS* ($r = 0.625$ and $r = 0.945$). IHC analysis showed that PGD2 positivity was strongly associated with increased disease-free survival ($p = 0.009$), absence of relapse ($p = 0.026$), and sensitivity to platinum therapy ($p = 0.040$). Cox multiple regression showed that the evaluation of PGD2 by IHC was also a prognostic marker related to relapse (HR: 0.37; $p = 0.002$), whereas MMP14 expression did not present correlation with prognostic factors. Evaluation of PGD2 by IHC shows an independent marker of good prognosis, contributing to the understanding of a mechanism of tumour regulation and biomarker research that predicts response to chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação do comportamento clínico de resistência à platina de acordo com a resposta a partir do término da quimioterapia.....	14
Figura 2	Fluxograma ilustrando o desenho do estudo.....	24
Figura 3	Representação esquemática do método de hibridização.....	28
Figura 4	Cluster dos 1149 genes pela distância euclidiana.....	40
Figura 5	Rede interativa gerada pelo <i>software</i> IPA.....	47
Figura 6	Análise de expressão gênica através das técnicas de <i>microarray</i> e qRT-PCR dos transcritos selecionados e avaliados por <i>Sybr green</i> e a correlação entre as duas técnicas.....	49
Figura 7	Expressão proteica por imuno-histoquímica do marcador PGD2....	56
Figura 8	Curva de sobrevida da proteína PGD2 avaliada no citoplasma das células tumorais pelo teste de <i>Kaplan-Meier</i>	59
Figura 9	Expressão proteica por imuno-histoquímica de MMP14 com marcação proteica no citoplasma e estroma tumoral.....	61
Figura 10	Curva de sobrevida da proteína MMP14 avaliada no citoplasma das células tumorais pelo teste de <i>Kaplan-Meier</i>	66
Figura 11	Curva de sobrevida de MMP14 avaliada no estroma das células tumorais pelo teste de <i>Kaplan-Meier</i>	69

Figura 12	Representação gráfica das amostras utilizadas no ensaio de IHQ e sua distribuição de acordo com os grupos de análise.....	71
Figura 13	PGD2 avaliado nos casos classificados como não seroso alto grau	76
Figura 14	Comparação das amostras de carcinomas seroso de alto grau e não seroso alto grau na avaliação de PGD2.....	77
Figura 15	- Curva de sobrevida de PGD2 avaliado nas 61 amostras não seroso alto grau pelo teste de <i>Kaplan-Meier</i>	79
Figura 16	MMP14 avaliado no citoplasma e estroma tumoral dos casos classificados como não seroso alto grau.....	81
Figura 17	- Comparação das amostras de carcinomas seroso de alto grau e não seroso alto grau na avaliação de MMP14 citoplasmático.....	82
Figura 18	Comparação das amostras de carcinomas seroso de alto grau e não seroso alto grau na avaliação de MMP14 estromal.....	86
Figura 19	- Curva de sobrevida de MMP14 avaliada no citoplasma nas 61 amostras não seroso alto grau pelo teste de <i>Kaplan-Meier</i>	89
Figura 20	Curva de sobrevida de MMP14 avaliada no estroma nas 61 amostras não seroso alto grau pelo teste de <i>Kaplan-Meier</i>	90

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Hipóteses sobre fatores de risco para o câncer de ovário epitelial..	2
Quadro 2	Estadiamento proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO).....	11
Quadro 3	Genes avaliados através de qRT-PCR e seus respectivos iniciadores.....	31
Quadro 4	Reação de imuno-histoquímica para os anticorpos MMP14 e PGD2..	35
Tabela 1	Subtipos histológicos e frequências dos carcinomas epiteliais do ovário.....	6
Tabela 2	Amostras selecionadas para a reação de expressão gênica em larga escala.....	25
Tabela 3	Valores de otimização da reação de PCR.....	32
Tabela 4	Lista de genes em comum entre os resultados de <i>microarray</i> e o banco de dados do TCGA.....	41
Tabela 5	Lista dos principais genes moduladores da comparação entre pacientes respondedoras e não respondedoras identificados usando o <i>software</i> IPA e taxas de sobrevida do <i>software</i> <i>K Mplotter</i>	42
Tabela 6	Avaliação funcional in silico dos 1149 genes candidatos a moduladores realizada no <i>software</i> Ingenuity Pathways Analysis (IPA) pelo banco de dados público KOBAS.....	44

Tabela 7	Doenças e funções biológicas obtidas através da análise de predição do <i>software</i> IPA.....	46
Tabela 8	Correlação entre os valores de <i>microarray</i> e qRT-PCR e seus respectivos valores estatísticos.....	48
Tabela 9	Dados clínico-patológicos dos 114 pacientes com carcinomas serosos de alto grau analisados em amostras arquivadas em parafina.....	51
Tabela 10	Sobrevida global e livre de doença dos dados clínicos e anatomopatológicos.....	53
Tabela 11	Taxa de risco relativo e seus respectivos intervalos de confiança para morte e recorrência da doença.....	55
Tabela 12	Distribuição de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de acordo com a expressão negativa a fraca e expressão moderada a forte da proteína PGD2 e dados clínicos e anatomopatológicos.....	58
Tabela 13	Estimativa de parâmetros do modelo de regressão Cox múltiplo para morte e recorrência na coorte avaliada em TMA.....	60
Tabela 14	Distribuição de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de acordo com expressão de MMP14 avaliados no citoplasma das células tumorais, dados clínicos e anatomopatológicos	63
Tabela 15	Distribuição de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de acordo com expressão de MMP14 avaliados no estroma das células tumorais, dados clínicos e anatomopatológicos.....	67

Tabela 16	Frequência dos dados clínico-patológicos das 61 amostras das demais histologias analisadas.....	73
Tabela 17	Taxa de risco relativo e seus respectivos intervalos de confiança para sobrevida global e sobrevida livre de doença das 61 amostras das demais histologias.....	74
Tabela 18	PGD2 avaliado nas diferentes histologias.....	75
Tabela 19	Avaliação de PGD2 nos 61 casos envolvendo os demais subtipos histológicos de acordo com dados clínicos e anatomopatológicos.....	78
Tabela 20	MMP14 citoplasmático avaliado nas diferentes histologias.....	80
Tabela 21	Avaliação de MMP14 citoplasmático nos 61 casos envolvendo os demais subtipos histológicos de acordo dados clínicos e anatomopatológicos.....	83
Tabela 22	MMP14 avaliado no estroma tumoral nas diferentes histologias....	85
Tabela 23	MMP14 avaliado no estroma tumoral dos 61 casos envolvendo os demais subtipos histológicos de acordo dados clínicos e anatomopatológicos.....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT	‘V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1’ Proteína quinase B
BRAF	“v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1”
BRCA	“Breast cancer gene”; Gene do câncer de mama
CCNA1	“cyclin A1”
CA125	“cancer antigen 125”
CID	código internacional da doença
CTNNB1	“catenin beta 1”
DNA	“deoxyribonucleic acid”
ERBB2	“erb-b2 receptor tyrosine kinase 2”
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FSH	hormônio folículo estimulante
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
GOG	Grupo de Oncologia Ginecológica
H2TC	Ferramenta de busca de documentos de paciente
HE	Hematoxilina e eosina
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HR	“Hazard ratio”; Razão de riscos
hMLH1	“MutL homolog 1”
hMSH2	“MutL homolog 2”
IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
IKK	complexo quinase do inibidor kB
KRAS	“Kirsten rat sarcoma”; Gene da família de oncogenes RAS
LIMMA	“linear models for microarray and RNA data”
LH	hormônio luteinizante
LOWESS	“Locally Weighted Scatterplot Smoothing”
MMP	“Matrix metalloproteinase”
MMP14	“Matrix metalloproteinase 14”
Máx	Máximo

Mín	Mínimo
N	Número amostral
NFκB	“Nuclear factor kappa-beta”; Fator nuclear kappa-beta
P	Nível de significância
PI3K	“Fosfatidil inositol 3,4,5 quinase OS“
PLCβ2	“Phospholipase C Beta 2“
PTGDS	“prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)”
PGD2	“Prostaglandin D2“
RAS	“rat sarcoma viral oncogene homolog”
RNA	“ribonucleic acid”
SPSS	“Statistical Package for the Social Sciences”
TCGA	“The Cancer Genome Atlas”
TMA	Tissue microarray Microarranjos de tecidos
TP53	Gene da proteína tumoral p53
Σ	Somatória
βACTIN	“beta actin“

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia e fatores de risco.....	1
1.2	Fatores clínicos	4
1.3	Origem e classificação histopatológica.....	5
1.4	Aspectos biológicos	8
1.5	Estadiamento e doença avançada.....	11
1.6	Tratamento e resposta	12
1.7	Biomarcadores e análises em larga escala	15
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo Geral.....	20
3.2	Objetivos Específicos.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Definições Clínicas	22
4.2	Pacientes e espécimes anatomopatológico.....	23
4.3	Expressão gênica em larga escala	26
4.4	Escolha dos genes para validação	29
4.5	PCR em tempo real para validação dos resultados de microarray	30
4.6	Confecção de Lâminas de Micro arranjo em Matriz de Tecidos (tissue microarray – TMA).....	33
4.7	Imuno-histoquímica	35
4.8	Análises proteica e determinação da pontuação na avaliação da IHQ.....	36
4.9	Análises Estatísticas	37
5	RESULTADOS	39
5.1	Análise da expressão gênica por qRT-PCR	48

5.2	Imuno-histoquímica	50
5.2.1	Caracterização da amostra utilizada na avaliação protéica	50
5.2.2	Avaliação de PGD2 nas amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau	56
5.2.3	Avaliação de MMP14 citoplasmático nas amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau	60
5.2.4	Avaliação de MMP14 no estroma tumoral das amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau	66
6	AVALIAÇÃO PROTÉICA NAS DEMAIS HISTOLOGIAS.....	72
6.1	Avaliação de PGD2 nas amostras não-seroso alto grau	75
6.2	Avaliação de MMP14 citoplasmático nas amostras não-seroso alto grau	79
6.3	Avaliação de MMP14 no estroma tumoral nas amostras não-seroso alto grau	85
7	DISCUSSÃO.....	91
8	CONCLUSÃO	109
9	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Artigo em fase de revisão [The Journal of Pathology: Clinical Research-Manuscript ID CJP-2017-07-0033] referente aos resultados apresentados.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DO CARCINOMA DE OVÁRIO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial e é a segunda maior causa de morte nos Estados Unidos (SIEGEL et al. 2017). No Brasil, de acordo com a Estimativa 2016, foram registrados no país 596 mil novos casos de câncer em 2016, sendo estes, 300.800 casos entre mulheres (Ministério da Saúde 2016). O câncer de ovário representa 5% das mortes por câncer entre as mulheres, causando mais mortes do que qualquer outro câncer ginecológico (American Cancer Society-ACS 2017) e estima-se que 22.440 novos casos de câncer do ovário serão diagnosticados nos EUA em 2017, estimando 14.080 mortes (ACS 2017). No Brasil, a estimativa do número de novos casos em mulheres em 2016 foi de 6.150 para câncer de ovário (ocupando a sétima posição, liderado por 57,960 novos casos para o câncer de mama) (Ministério da Saúde 2016). A idade mediana ao diagnóstico é em torno de 60 anos e pacientes selecionados na maioria dos testes randomizados tem a média de 58 anos (JAYSON et al. 2014). Mulheres com uma predisposição genética ao câncer de ovário são diagnosticadas aproximadamente 10 anos antes da idade mediana do diagnóstico (MAVADDAT et al. 2013).

Estudos epidemiológicos de câncer de ovário buscam identificar fatores de risco que possam ajudar a definir grupos de mulheres expostas ao elevado risco da doença ou sugerir hipóteses etiológicas pelo seu potencial agressivo. Os fatores de

risco descritos para desenvolver o câncer de ovário estão relacionados a um dos quatro mecanismos de carcinogênese propostos no Quadro 1:

Quadro 1 - Hipóteses sobre fatores de risco para o câncer de ovário epitelial

Hipótese	Mecanismo
Ovulação Incessante	Dano do epitélio durante a ovulação levando a susceptíveis mutações
Estimulo por gonadotrofina	Efeito estimulante da FSH e da LH promove o crescimento, aumento das divisões celulares e mutações
Estímulo hormonal	Altas concentrações de andrógenos no microambiente do tumor promovem a carcinogênese, enquanto que as progestinas diminuem o risco
Inflamação	O epitélio danificado com ovulação induz inflamação, o que promove a susceptibilidade à mutação

Legenda: FSH: hormônio Folículo Estimulante, LH: hormônio luteinizante

As ovulações contínuas causam ao epitélio uma repetitiva ruptura e reparo, podendo conduzir a uma maior probabilidade de mutações espontâneas, que podem levar a um fenótipo neoplásico (FLEMING et al. 2006). FATHALLA em 1971 descreve essa hipótese combinando observações sobre o câncer de ovário espontâneo em animais, e em dados epidemiológicos sobre fatores de risco em seres humanos. A hipótese sugere que quanto maior o número total de ciclos ovulatórios, maior será o risco para o desarranjo do mecanismo de reparação do organismo, levando ao surgimento da doença.

Dentre outros fatores que aumentam o risco de câncer de ovário podemos citar o histórico reprodutivo da mulher, principalmente pela idade de menarca e menopausa, gestações e amamentação e pela infertilidade (WEBB e JORDAN 2016). Estes fatores podem ser reunidos em um índice de "tempo de proteção" que envolve eventos reprodutivos que diminuem ciclos ovulatórios ao longo da vida, e como

complemento a "idade de ovulação", esse referente a tempo de menarca e menopausa (CASAGRANDE et al. 1979).

Com relação ao estímulo pelas gonadotrofinas circulantes, essas estimulariam as células epiteliais ovarianas induzindo alterações neoplásicas, principalmente pela presença de FSH no qual regula muitos oncogenes (CHOI et al. 2004) e promove o crescimento em modelos pré-clínicos (WHITTEMORE et al. 1992). Já os andrógenos circulantes (presente na síndrome do ovário policístico, hirsutismo e acne) estão associados ao risco aumentado para desenvolvimento da doença (EDMONDSON et al. 2002).

Os estímulos inflamatórios relacionados a própria ovulação ou doenças ginecológicas como a endometriose e a doença inflamatória pélvica estão envolvidos com o aumento do risco da doença. Este mecanismo propõe que o estresse sofrido nas células da superfície do epitélio do ovário predispõe ao dano genético e à transformação maligna e podem apresentar um possível risco reduzido com o uso de anti-inflamatório não esteroide (ALTINOZ e KORKMAZ 2004)

Outro fator de risco de câncer de ovário é a história familiar de câncer de ovário ou câncer de mama. Embora o risco de desenvolvimento de câncer de ovário na população em geral é de 1,6%, as mulheres com um parente de primeiro grau com câncer de ovário têm um risco de aproximadamente 5%, e as mulheres com dois parentes de primeiro grau com câncer de ovário têm um risco de 7% (STRATTON et al. 1998; WERNESS e ELTABBAKH 2001).

Na última década, a base molecular da predisposição hereditária ao câncer de ovário tem sido amplamente documentada. Pacientes com história familiar de câncer de ovário são classificados em 3 grupos principais: (1) História familiar de câncer de ovário somente (sitio específico), (2) História familiar de câncer de mama e / ou

ovário (síndrome de câncer de mama e ovário hereditário), e (3) História familiar de Câncer colorretal hereditário não poliposo (TRIFONOV et al 2001; WERNESS e ELTABBAKH 2001).

Os dois primeiros grupos estão associados a mutações de linha germinativa nos genes supressores de tumores *BRCA1* e *BRCA2* (MIKI et al. 1994) (TAVTIGIAN et al. 1996) e mulheres portadoras dessa síndrome apresentam um risco de 30-60% de desenvolver a doença, enquanto que a síndrome HNPCC (também chamada de síndrome de Lynch) está associada a mutações de linha germinativa nos genes relacionados ao reparo do DNA, principalmente *hMLH1* e *hMSH2* (LINDBLOM et al. 1993) o que aumenta em cerca de 8% o risco de desenvolver o câncer de ovário. Atualmente, é aceito que pelo menos 10% de todos os cânceres de ovário epitelial são hereditários, com mutações nos genes *BRCA* responsáveis por aproximadamente 90% dos casos e os 10% restantes atribuíveis a história familiar de câncer colorretal hereditário não poliposo (TRIFONOV et al 2001; WERNESS e ELTABBAKH 2001).

1.2 FATORES CLÍNICOS

Apesar da apresentação de alguns sintomas no câncer de ovário, eles podem ser inicialmente perdidos ou atribuídos a outros processos patológicos por serem, na maioria das vezes inespecíficas (MATULONIS et al. 2016). Presença de ascite na cavidade peritoneal e disfunção gastrointestinal, por exemplo, constipação, obstrução intestinal, diarreia, náuseas, vômitos e refluxo gastrointestinal. Outros sintomas na apresentação inicial incluem inchaço abdominal, dor abdominal ou pélvica, fadiga e dificuldade de respiração (GOFF et al. 2000).

Diante aos vagos sintomas gerais, consequentemente, o diagnóstico ocorre quando o câncer atinge um estadiamento avançado. De acordo com o manual de conduta da ginecologia oncológica do A.C.Camargo Cancer Center a paciente é submetida à avaliação clínica para descartar a origem não-ginecológica, em seguida submetida a avaliação dos níveis séricos de CA125 e ultrassonografia pélvica (BAIOCCHI NETO et al. 2017). A dosagem de CA125 também pode ser usado em combinação a outros testes, como dosagem de HE4 (proteína do epidídimo humano 4) que é frequentemente hiper expressa no carcinoma de ovário, mas não no tecido normal (WU et al. 2012). HE4 em combinação com CA125 em uma pontuação de risco de malignidade (ROMA) pode classificar com sucesso as pacientes de alto risco de malignidade de pacientes com baixo risco, comprovando sua eficácia quando usados juntos (MOORE et al. 2009)

Mesmo com a eficácia de métodos diagnósticos e a avaliação clínica, a maioria dos tumores do ovário não pode ser distinguida com segurança embasado somente nessas características. Os recursos descritos fornecem importantes pistas de diagnóstico em alguns casos, no entanto, tanto o clínico quanto o patologista devem compartilhar informações no estabelecimento de um diagnóstico correto.

1.3 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

São observados quatro tipos de tumores ovarianos: tumores superfície epitelial (65% a 70%), tumores de cordão sexual (15% a 20%), tumores de células germinativas (5% a 10%) e 4% de tumores metastáticos originados em outros sítios primários (KAKU et al. 2003; CHEN et al. 2003). Os tumores definidos como tumores epitelial-estromal de superfície são responsáveis por cerca de dois terços de

todos os tumores ovarianos, e estes representam cerca de 90% dos cânceres de ovário no mundo ocidental (CHEN et al. 2003).

Os tumores epiteliais do ovário apresentam cinco principais subtipos histológicos, com suas próprias características morfológicas, moleculares e clínicas, e, desta forma, são considerados doenças completamente distintas (PRAT 2012a). Estes subtipos histológicos incluem: carcinoma seroso de alto e baixo grau, carcinoma endometrióide, carcinoma de células-claras e carcinoma mucinoso (DAVIDSON e TROPÉ 2015). Ainda, os tumores epiteliais são subdivididos em benigno, borderline (baixo potencial de malignidade) e maligno, de acordo com o grau de proliferação e atipia nuclear (PRAT 2012b) Tabela 1

Tabela 1 - Subtipos histológicos e frequências dos carcinomas epiteliais do ovário.

Tipo histológico	Frequência (%)
Seroso de alto grau	70
Endometrióide	10
Células-claras	10
Mucinoso	3-4
Seroso de baixo grau	<5

Fonte: Adaptado de PRAT (2012a)

Os tumores serosos são tumores ovarianos caracterizados em sua forma diferenciados por tipos celulares semelhantes a da trompa uterina (RESCIGNO et al. 2013). Juntamente com os recentes avanços na compreensão da patogênese molecular destes tumores, estudos demonstraram através da busca por uma lesão precursora para o subtipo seroso que essa parece desenvolver-se a partir de um carcinoma intra-epitelial oculto na região da tuba uterina que envolve secundariamente o ovário. Seu desenvolvimento no ovário se dá pela implantação do

epitélio fimbrial na superfície do ovário no local de ruptura quando ocorre a ovulação (KURMAN 2013).

Sua forma maligna é chamada de adenocarcinoma seroso e na avaliação histológica, o estroma pode ser escasso ou desmoplástico e a arquitetura celular variam de glandular para papilar e sólido. As glândulas são geralmente em forma de fendas ou irregulares e as papilas são tipicamente irregulares, ramificadas e altamente celulares (TAVASSOLI e DEVILEE 2003; KURMAN et al. 2014).

Esse subtipo histológico também é classificado como de baixo grau ou alto grau com base na extensão da atipia nuclear e figuras de mitose (MALPICA et al. 2004). Morfologicamente, o adenocarcinoma seroso de baixo grau tem atipia nuclear mínima e baixos índices mitóticos e também são diferentes quanto aos níveis genômico e moleculares (ROSEN et al. 2009). Tem sido proposto que tumores de baixo grau surgem de um cistoadenoma ou adenofibroma, que progride para um tumor seroso proliferativo atípico (VANG et al. 2009).

O adenocarcinoma seroso de alto grau corresponde ao subtipo mais comum dos carcinomas, representando aproximadamente 90% dos carcinomas serosos (GROSS et al. 2010). Esses tumores são compostos de grandes massas de células que frequentemente exibem uma arquitetura papilar. A necrose é uma característica comum e as células tumorais apresentam grandes núcleos pleomórficos, muitos dos quais são multinucleados. Alto nível de atividade mitótica e figuras mitóticas anormais são frequentes (KURMAN E SHIH 2008).

Com base em observações morfológicas e uma série de estudos moleculares, é considerado a natureza diversa do câncer de ovário devido às suas diferenças quanto ao comportamento biológico. Estudos que propuseram um modelo dualista que classifica vários tipos de câncer de ovário em dois tipos. Tumores do Tipo I são

cl clinicamente indolentes e geralmente se apresentam em um baixo estadiamento. Esse processo geralmente envolve um caminho relativamente lento que surge de lesões precursoras bem caracterizadas entre neoplasias císticas benignas e borderline, apoiando uma progressão morfológica contínua na progressão tumoral nessas neoplasias. Exemplos de subtipos que seguem essa sequência de eventos incluem carcinoma seroso de baixo grau, carcinoma endometriode de baixo grau, carcinomas de células claras e mucinosos (SHIH e KURMAN 2004; KURMAN e SHIH 2010).

Os tumores de Tipo II exibem padrões papilares, glandulares e sólidos e são diagnosticados em sua maioria como serosos de alto grau e carcinomas indiferenciados, dependendo do padrão dominante. Além destas neoplasias, os tumores mesodérmicos malignos mistos (carcinosarcomas) também estão incluídos na categoria do tipo II, porque possuem componentes epiteliais idênticos aos carcinomas de tipo II. Tumores do tipo II são agressivos, e parecem desenvolver-se rapidamente, apresentando-se quase sempre em um estágio avançado (KURMAN e SHIH 2008; KURMAN e SHIH 2010). Os tumores são compostos de grandes massas de células que muitas vezes exibem uma arquitetura papilar e as células tumorais mostram grandes núcleos pleomórficos, alto nível de atividade mitótica e frequente figura de mitose anormal (KURMAN e SHIH 2010).

1.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS

É amplamente aceito que o caminho que leva à formação de um tumor é um processo de múltiplos passos que envolvem o acúmulo de alterações genéticas. Nesse contexto, mutações podem surgir devido ao aumento da proliferação epitelial necessário para reparar o dano criado pela ruptura de um folículo do ciclo ovulatório

(FATHALLA 1971; CASAGRANDE et al. 1979). Concomitantemente o estresse oxidativo e formação de radicais livres como resultado do processo de inflamação e reparo do local da ovulação pode contribuir para acúmulo de danos do DNA (NESS e COTTREAU 1999; FLEMING et al. 2006).

As diferenças clínicas e patológicas entre os tumores do tipo I e do tipo II são refletidos por diferenças marcantes em suas características moleculares (CHO e SHIH 2009). Como um grupo, os tumores do tipo I são geneticamente mais estáveis do que os tumores do tipo II e mostram mutações específicas nos diferentes tipos de células histológicas (KURMAN e SHIH 2008).

As alterações de tumores de tipo I se caracterizam por apresentar uma alta frequência de mutações de *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1* (gene que codifica a beta catenina) e *PIK3CA*, baixa proliferação e uma melhor sobrevida quando comparados aos tumores de tipo II (SHIH e KURMAN 2004). Assim, as mutações de *KRAS*, *BRAF* e *ERBB2* ocorrem em aproximadamente dois terços dos carcinomas serosos de baixa grau (VANG et al. 2009). Carcinomas endometriode de baixo grau têm alterações na via de sinalização de Wnt envolvendo mutações somáticas de *CTNNB1*, *PTEN* e *PIK3CA* (CHO e SHIH 2009). Carcinomas mucinosos têm mutações *KRAS* em mais de 50% de espécimes (MOK et al. 1993) e carcinomas de células claras apresentam comportamento único por terem alta porcentagem de mutações ativadoras de *PIK3CA* (KUO et al. 2009).

Adenocarcinoma seroso de alto grau, o tumor prototípico do tipo II caracteriza-se por mutações frequentes em *TP53* (> 80% dos casos) e amplificação de *CCNE1* (codificação de ciclina E1), mas raramente mutações que caracterizam a maioria dos tumores de tipo I (CHO e SHIH 2009). Localizado no cromossomo 17, *TP53* codifica uma proteína (p53) cujas funções envolvem a detecção de danos no

DNA e regulação do ciclo celular (GREENBLATT et al. 1994; LEVINE 1997) e a perda da sua função culmina na perda do controle do ciclo celular, contribuindo para a tumorigênese (GREENBLATT et al. 1994; HAVRILESKY et al. 2003).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* desempenham importantes funções em diferentes processos celulares, incluindo a ativação e a regulação transcricional, o reparo de lesões no DNA, além do controle do ciclo celular, da proliferação e diferenciação celular (Venkitaraman 2002). No câncer de ovário, em especial o subtipo histológico seroso de alto grau, as alterações mais frequentes nesses genes são mutações envolvendo ponto de troca, deleções de sequência e hipermetilação do DNA (TCGA 2001). Esses genes estão envolvidos na via de reparo do DNA da recombinação homóloga e suas alterações favorecem a grande instabilidade genética da célula.

Alterações desta via estão presentes em até 50% dos casos de adenocarcinoma seroso de alto grau, podendo ocorrer por mutações germinativas do *BRCA1* e *BRCA2* em aproximadamente 15% dos casos, mutações somáticas e silenciamento epigenético do *BRCA1* e *BRCA2* em 14 a 22% e, em menor frequência, por outras alterações de proteínas ligadas a esta via: amplificação do *EMSY* (8% dos casos), deleção do *PTEN* (7% dos casos), hipermetilação do *RAD51C* (2% dos casos) e outros mecanismos ainda mais raros (TCGA 2011)

Este modelo de divisão da doença em tipo I e tipo II não substitui a classificação padrão histopatológico de carcinoma de ovário e resume de forma clássica a divisão do câncer de ovário em dois grandes grupos, chamando a atenção para o fato de ser uma doença que se desenvolve de formas diferentes e também se comporta de formas diferentes.

1.5 ESTADIAMENTO E DOENÇA AVANÇADA

O sistema de estadiamento utilizado para o câncer de ovário é adotado de acordo com o proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) descrito no Quadro 2

Quadro 2 – Estadiamento proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO)

FIGO I	Tumor limitado aos ovários.	
	IA	Tumor limitado a um ovário, cápsula intacta, sem tumor na superfície externa.
	IB	Tumor envolve os dois ovários, cápsula intacta, sem tumor na superfície externa.
	IC	Tumor restrito a um ou ambos os ovários
FIGO II	Tumor com extensão à pélvis ou primário do peritônio.	
	IIA	Extensão e/ou metástases para o útero e/ou tuba uterina.
	IIB	Extensão para outros tecidos pélvicos
FIGO III	Tumor com implantes além da pélvis e/ou linfonodos intra-abdominais comprometidos. Também considerar como tumor limitado à pélvis, mas com extensão direta ao intestino delgado ou omento.	
	IIIA	Linfonodos comprometidos e/ou disseminação peritoneal microscópica além da pélvis
	IIIB	Presença de implante peritoneal extra-pélvico de tamanho =2cm no maior diâmetro. Inclui extensão para superfície hepática e/ou esplênica.
	IIIC	Presença de implante peritoneal extra-pélvico de tamanho >2cm no maior diâmetro. Inclui extensão para superfícies hepática e/ou esplênica.
FIGO IV	Presença de metástases à distância	
	IVA	Derrame pleural com citologia positiva
	IVB	Metástases para parênquima hepático ou esplênico. Metástase para órgãos extra-abdominais, incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal.

Fonte: Adaptado de: BAIOCCHI NETO et al. (2017)

O câncer de ovário é um tumor de difícil diagnóstico e baixas chance de cura porque o estadiamento precoce geralmente é assintomático e aproximadamente 75% das mulheres apresentam doença avançada no momento do diagnóstico (COLOMBO et al. 2006). Para o carcinoma de ovário, uma vez que as células cancerosas se separaram como células únicas ou aglomerados do tumor primário, pensa-se que eles se propagam através de um mecanismo passivo, levado pelo movimento fisiológico do líquido peritoneal para o peritônio e omento. A observação e estudos clínicos retrospectivos sugerem que o carcinoma seroso de ovário cresce de forma muito eficiente dentro da cavidade peritoneal com um menor número de metástases extra-abdominais (LENGYEL 2010).

1.6 TRATAMENTO E RESPOSTA

A cirurgia geralmente é o tratamento inicial para mulheres com câncer de ovário. Um estadiamento cirúrgico preciso e uma citorredução de tumor ideal seguida de quimioterapia à base de platina é o padrão de cuidados no manejo dessa doença e resulta em uma melhor sobrevida do paciente. A intenção do procedimento cirúrgico primário é estabelecer um diagnóstico, avaliar a extensão da doença e remover o tumor o quanto possível (FADER e ROSE 2007).

Quanto ao momento da citorredução, ela pode ser classificada como primária quando realizada antes do tratamento de quimioterapia, citorredução de intervalo, quando é realizada imediatamente após alguns ciclos de quimioterapia, e secundária quando é realizada no momento da recidiva da doença (FADER e ROSE 2007). A citorredução pode ser também classificada quanto ao volume de doença residual (macroscópica e microscópica, essa considerada citorredução completa).

A citorredução completa confere um prognóstico melhor do que a citorredução com doença residual macroscópica mesmo em relação aquelas pacientes com doença residual com volume menor que 1cm. Por isso, hoje o termo citorredução ótima deve ser empregado para os casos que chegam a doença residual microscópica. Este é um dos principais fatores prognósticos juntamente com estágio e subtipo histológico da paciente (DU BOIS et al. 2009; CHANG et al. 2013).

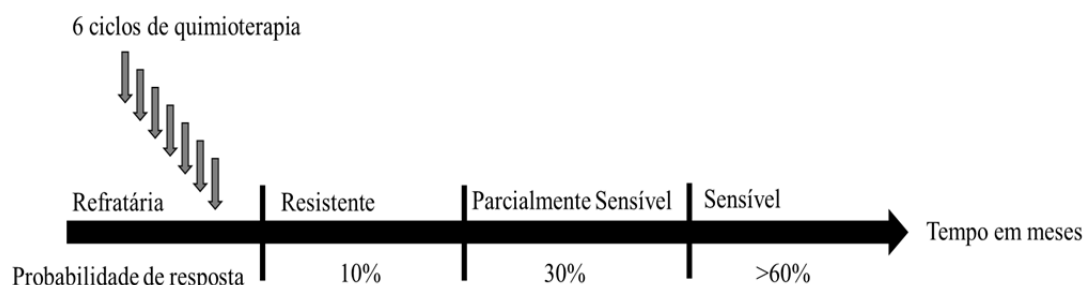
O regime carbo-taxol foi estudado como terapia adjuvante no câncer de ovário e tratamento primário da doença recidivada (National Institute for Health and Clinical Excellence 2005; LEDERMANN e KRISTELEIT 2010). O mecanismo de ação do taxol interfere na função normal de crescimento do microtúbulo do citoesqueleto celular, impedindo a divisão descontrolada da célula (WEAVER 2014) e, similar aos agentes alquilantes, a carbopatina interfere com ligações ao DNA, induzindo alterações estruturais. As rupturas da cadeia de fita dupla requerem reparo pela via de recombinação homóloga e pacientes que detém alterações em *BRCA1* e *BRCA2* ou qualquer outro gene envolvido nessa via, são sensíveis ao tratamento com platina e têm uma sobrevida prolongada do que as pacientes que não as possuem (CHETRIT et al. 2008).

As diretrizes atuais recomendam carbo-taxol como principal terapia adjuvante para todos os estadiamentos do câncer de ovário, como terapia para tumores recorrentes sensíveis à platina e como terapia neo-adjuvante para pacientes com doença avançada e para candidatos não elegíveis a cirurgia (National Institute for Health and Clinical Excellence 2005)

O objetivo principal da quimioterapia contra o câncer é direcionar células tumorais para apoptose. Embora a cisplatina seja uma droga muito potente para o tratamento do câncer de ovário, a resistência se desenvolve quando as células

tumorais não sofrem apoptose mesmo em concentrações clinicamente relevantes da droga. Essa resistência pode ser adquirida através de exposição crônica ao medicamento ou pode se apresentar como um fenômeno intrínseco (KELLAND 2007; LEAMON et al. 2013)

Em casos de recorrência, a doença pode ser dividida em três cenários (Figura 1), baseado na classificação clínica prévia de acordo com o intervalo entre o final do tratamento inicial (com relação a última infusão de platina) e a recorrência. A doença refratária é considerada quando a progressão ocorre durante o tratamento (10% dos casos), resistente caso ocorra até 6 meses após o término do tratamento (30% dos casos); platina sensível caso ocorra após 12 meses e com sensibilidade intermediária a platina caso ocorra entre 6 e 12 meses (50-55% dos casos com sensibilidade intermediária ou completa) (COLOMBO et al. 2014).



Fonte: Adaptado de COOKE e BRENTON (2011).

Figura 1 - Classificação do comportamento clínico de resistência à platina de acordo com a resposta a partir do término da quimioterapia

Em contraste com outros tipos de câncer epitelial de ovário, o câncer seroso de alto grau é inicialmente sensível à quimioterapia baseada em platina, embora os desfechos clínicos sejam baixos (com uma sobrevida de 5 anos inferior a 30%) e as

recidivas tipicamente caracterizadas pelo desenvolvimento progressivo da resistência a droga (COOKE e BRENTON 2011; COLOMBO et al. 2014).

1.7 BIOMARCADORES E ANÁLISES EM LARGA ESCALA

Apesar de importantes avanços na compreensão do câncer de ovário, a sobrevida global de mulheres com a doença não alterou com os anos, pois os estudos de rastreio realizados ao longo das últimas décadas falharam em fornecer benefícios para a sobrevida das pacientes. Atualmente, o manejo dos tumores é dirigido pelos mecanismos dos quais o câncer se desenvolve, porém para o câncer de ovário estes mecanismos não são totalmente elucidados e fornecem perspectivas baixas na redução dos efeitos desta doença (MU WANG et al. 2014).

Com a introdução da tecnologia de *microarray*, a conclusão do projeto do genoma humano e o surgimento do campo da bioinformática, muitos avanços foram feitos na análise da expressão gênica, tecnologia capaz de fornecer informações importantes para vários tipos de câncer, permitindo a avaliação simultânea de vários processos celulares. A descoberta de biomarcadores proteicos cuja mudança no nível ou estado de expressão se correlaciona com a progressão de uma doença está se tornando cada vez mais importante. Uma vez validado, os biomarcadores podem estar envolvidos no diagnóstico precoce e diferenciado de várias doenças, incluindo proteínas que estão associadas a uma variedade de cânceres (RUSSO et al. 2003; GRANT et al. 2004).

Hoje é possível listar alguns biomarcadores que utilizam diagnóstico molecular, implantados com êxito na prática clínica de terapia personalizada para o tratamento de câncer, como por exemplo, os inibidores da tirosina quinase na

leucemia mielóide crônica e tumores gastrointestinais; inibidores de ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) em câncer de pulmão com a fusão gênica EML4-ALK; bloqueio *HER2/neu* no câncer de mama em células positivas para esse marcador e a inibição dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em câncer de pulmão para células que carregam *EGFR* mutado (NALEJSKA et al. 2014; KALIA 2015). Testes de perfil molecular para estratificação de risco também são opções para orientar decisões sobre terapia sistêmica adjuvante, por exemplo *MammaPrint* e *Oncotype DX* que ajudam na tomada de decisão sobre formas de tratamento após cirurgia e seus benefícios para pacientes com câncer de mama.

Já no adenocarcinoma seroso de alto grau, a descoberta de biomarcadores com base em abordagens genômicas mostrou os inibidores de PARP como drogas alvo direcionadas para pacientes portadoras de mutação germinativa ou somática no gene *BRCA* (LEDERMANN et al. 2012, MATULONIS et al. 2016). A sensibilidade à inibição de PARP foi observada em células com defeitos na via de reparo do DNA da recombinação homóloga, responsável por atuar no reparo a danos que interferem no pareamento das bases no DNA, no qual os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos e onde formam parte de alguns complexos proteicos que atuam em diferentes momentos da via de reparo ao DNA (MCCABE et al 2006; LEDERMANN et al 2016). Vários inibidores de PARP estão agora em estágios de desenvolvimento clínico e Olaparib é a droga sobre a qual existem mais relatos em literatura e que mostrou benefício com relação a sobrevida livre de progressão em pacientes com alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (LEDERMANN et al. 2014).

Embora as características morfológicas sejam importantes para a classificação do câncer, pouca pesquisa tem sido relatada correlacionando o perfil histológico e molecular com resposta a quimioterapia no câncer de ovário. Dessa forma, a

avaliação em larga escala das amostras de pacientes portadoras de adenocarcinoma seroso de alto grau, que representa o principal subtipo do câncer ovário e o principal responsável pela alta taxa de mortalidade, permitirá identificar as alterações moleculares mais prevalentes em mulheres com diferentes respostas a quimioterapia e a identificação de biomarcadores mais sensíveis ao diagnóstico precoce.

2 JUSTIFICATIVA

Um fator crítico que pode introduzir viés e interpretações erradas sobre um biomarcador é a seleção das amostras. Grande parte dos estudos que avaliam novos potenciais biomarcadores é composta de amostras heterogêneas. Essas coortes representam a frequência de uma população heterogênea de indivíduos que têm um diagnóstico específico, mas cujas características clínico-patológicas e tratamentos podem diferir (HENRY e HAYES 2012).

A fim de minimizar as diversas interferências na evolução clínica das pacientes, o presente estudo propôs realizar a análise de genes diferencialmente expressos no subtipo histológico mais frequente e de alta complexidade genômica. As pacientes selecionadas apresentam tumor seroso de alto grau, submetidas à cirurgia de retirada máxima do tumor, estadiadas clinicamente por oncocirurgiões ginecológicos, tratadas com agentes de platina e taxanos, acompanhadas clinicamente com monitoramento de CA125 sérico e exames de imagem por, no mínimo, dois anos.

De acordo com a literatura, a maioria das pacientes diagnosticadas apresentam doença avançada e aproximadamente 10% a 15% conseguem remissão a longo prazo, no entanto, o restante tende a sofrer progressão da doença (ARMSTRONG 2002). Embora a maioria das mulheres com adenocarcinoma seroso de alto grau tenham boa resposta a quimioterapia após cirurgia primária, uma considerável parcela dessas pacientes irá recair após a primeira linha de tratamento. (COOKE e BRENTON 2011; BERNS e BOWTELL 2012).

Apesar das pacientes apresentarem homogeneidade quanto ao tipo de tumor, estadiamento e características clínicas, estas possuem heterogeneidade quanto à resposta a quimioterapia. Tal fenômeno instiga investigação para a elucidação dos mecanismos que envolvem a recorrência da doença. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo identificar marcadores biológicos responsáveis pela progressão tumoral bem como associá-los a valores prognósticos de resposta terapêutica em câncer de ovário.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores moleculares que possam estar envolvidos no adenocarcinoma seroso de alto grau, através da análise de expressão gênica em larga escala comparando grupo de mulheres respondedoras ou não respondedoras a quimioterapia e, assim, determinar melhores e mais acurados marcadores prognósticos e preditivos de resposta à quimioterapia neste subtipo tumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar, através de análise de expressão gênica em larga escala, genes diferencialmente expressos entre o grupo de mulheres respondedoras e não respondedoras à quimioterapia;
- 2 Validar por meio de RT-PCR quantitativo (reação em cadeia da polimerase em tempo real) os genes diferencialmente expressos selecionados nesse estudo;
- 3 Comparar os achados de expressão gênica validados com resultados de expressão proteica por imuno-histoquímica em 114 casos de adenocarcinoma seroso de alto grau de ovário;

- 4 Correlacionar os achados imunohistoquímicos com fatores prognósticos bem estabelecidos em anatomia patológica, dados clínicos das pacientes e tempo de sobrevida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DEFINIÇÕES CLÍNICAS

É da natureza do carcinoma de ovário um curso clínico de difícil detecção nos pacientes individualmente. Uma fração dos pacientes será curada pela cirurgia seguida de quimioterapia, outro grupo evoluirá com uma possível recidiva da doença após um intervalo de 1 ou 2 anos, os outros terão sua recidiva em poucos meses de completar o tratamento de primeira linha, dessa forma a resposta ao tratamento foi definida levando-se em conta a descrição em prontuário de melhora clínica, bem como exames de imagem e mudanças nos níveis de CA125 ao longo do tempo de acompanhamento e avaliado de acordo com risco específico de cada paciente; e a “não resposta” nos casos de progressão da doença após a conclusão da quimioterapia de primeira linha. Conclusão da primeira linha quimioterapia foi considerada a partir da data da última aplicação de platina.

A sobrevida global foi definida a partir do intervalo de tempo entre a data do diagnóstico inicial e a data do último acompanhamento e considerando o evento óbito por qualquer causa e sobrevida livre de doença foi definida como o intervalo de tempo da cirurgia e progressão da doença.

Os dados das pacientes foram coletados de forma retrospectiva de acordo com informações das consultas ambulatoriais. As pacientes foram classificadas a partir do seguimento em:

- a) Não recidivadas

- b) Recidivadas
 - i. Durante o tratamento
 - ii. Entre 6 meses após a última infusão de platina
 - iii. Entre 6 a 12 meses após a última infusão de platina
 - iv. Após 12 meses da última infusão de platina
- c) Óbito
- d) Perda de seguimento

4.2 PACIENTES E ESPÉCIMES ANATOMOPATOLÓGICO

A busca pelas amostras a serem utilizadas para análise de expressão gênica partiu da disponibilidade de amostras de tecido a fresco do banco de macromoléculas. As pacientes foram identificadas no banco de dados eletrônico do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center por meio de uma busca pelo código internacional da doença (CID) C56, mostrando a disponibilidade de 208 amostras de câncer de ovário no geral. O desenho geral do estudo está resumido na Figura 2.

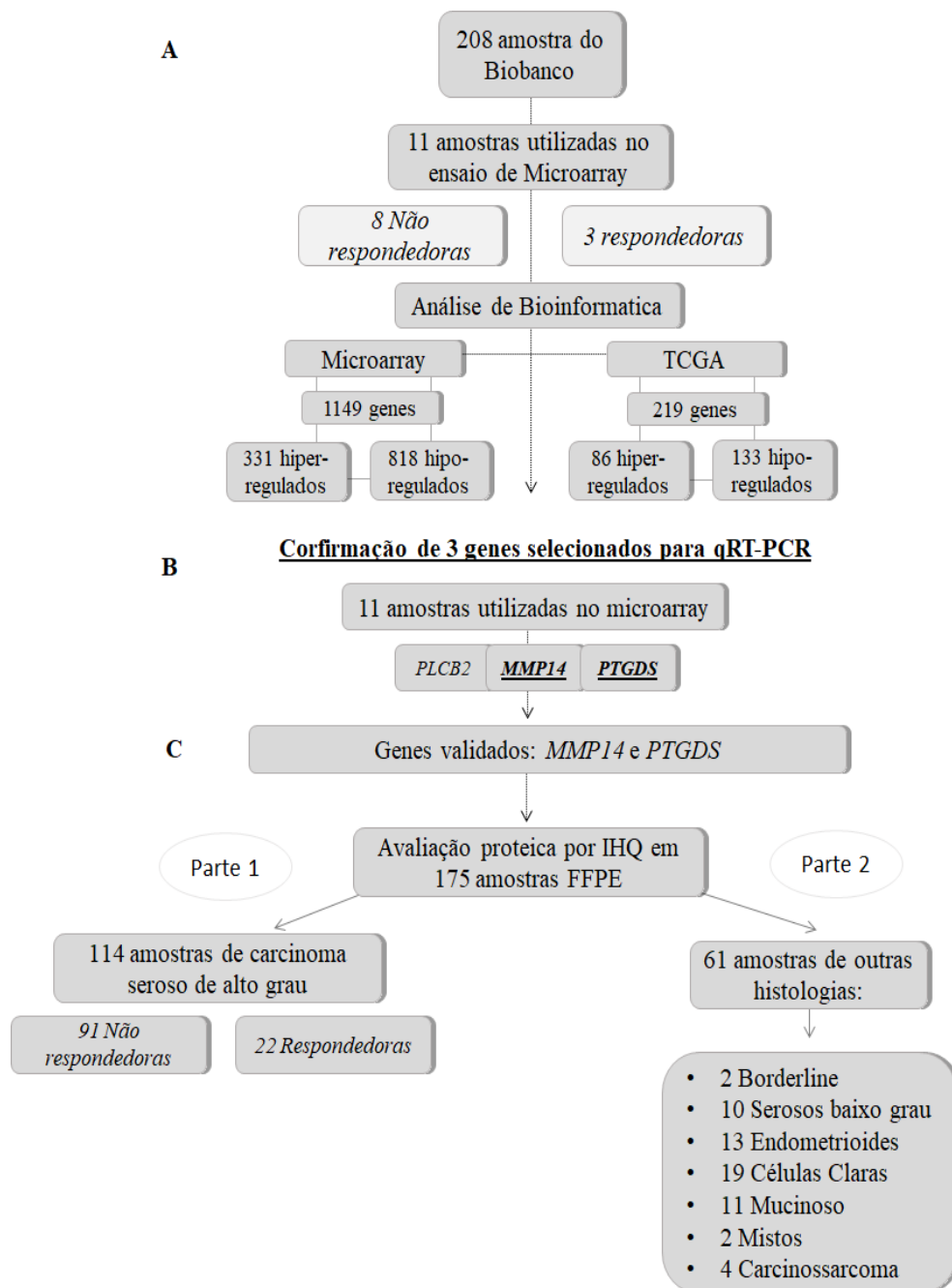


Figura 2 - Fluxograma ilustrando o desenho do estudo. **A)** Seleção de amostra entre 208 amostras disponíveis no bio banco da instituição. Todas as amostras selecionadas seguiram rigorosos fatores de exclusão para estabelecer um grupo homogêneo de análises. Para comparar os conjuntos de dados de *microarrays*, as *probes* diferencialmente expressas foram analisados de acordo com presença ou não de recorrência da doença (respondedoras vs não respondedoras). **B)** Análise de qRT-PCR foi utilizada para confirmar alterações de transcritos detectadas por *microarray* em todas as 11 amostras selecionadas e os genes *MMP14* e *PTGDS* foram validados pela técnica, mostrando uma correlação significativa entre os resultados de *microarray* e qRT-PCR. **C)** associamos o produto proteico de *MMP14* e *PTGDS* (PGD2) com os dados anatomopatológicos das pacientes utilizando a técnica de IHQ em um grupo de 114 amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau, seguida de uma avaliação em 61 amostras, incluindo as demais histologias.

Foram considerados critérios de inclusão:

- Carcinomas de ovário serosos de alto grau
- Citorredução ótima
- Pacientes com estadiamento FIGO III
- Disponibilidade de tecido a fresco
- Pacientes que receberam o mesmo esquema terapêutico

Foram considerados critérios de exclusão:

- Pacientes que foram submetidas a tratamento neoadjuvante
- Pacientes que só utilizaram do tratamento cirúrgico

De acordo com a nossa seleção que seguiu um critério rigoroso de seleção, a fim de criar um grupo homogêneo de análise, 11 amostras de tecido a fresco de adenocarcinoma seroso de alto grau foram selecionados de forma retrospectiva dos arquivos do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center do período de janeiro de 2003 a dezembro 2010 (Tabela 2).

Tabela 2 - Amostras selecionadas para a reação de expressão gênica em larga escala.

Amostras	Idade ao Diagnóstico	Integridade no RNA (RIN)	Estadiamento FIGO	Grupo	Resposta	Sobrevida Livre de Doença
46	55	9,1	IIIC	Respondedoras	Não recidivadas	23,9
36	45	8,8	IIIC	Não respondedoras	Sensível	13,6
43	43	9,1	IIIC	Não respondedoras	Parcialmente sensível	8,9
48	43	5,1	IIIC	Não respondedoras	Parcialmente sensível	8,3
40	52	9,2	IIIC	Não respondedoras	Resistente	2,0
42	58	8,6	IIIC	Respondedoras	Não recidivadas	22,5
41	69	6,4	IIIC	Não respondedoras	Resistente	6,3
4288	71	5,1	IIIC	Não respondedoras	Sensível	20,9
37	58	5,4	IIIB	Não respondedoras	Sensível	21,2
39	68	6,5	IIIC	Respondedoras	Não recidivadas	34,6
64	45	8,9	IIIC	Não respondedoras	Sensível	14,0

Toda a coleta de dados clínicos foi realizada utilizando a ferramenta de busca de documentos de paciente H2TC disponível no sistema online da instituição. Os seguintes dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos das pacientes foram coletados dos prontuários do hospital: idade ao diagnóstico, tipo de cirurgia (quanto ao volume de doença residual), status desempenho (escala de 0 a 5 usada para quantificar o bem-estar geral dos pacientes com câncer e as atividades da vida diária), tratamento quimioterápico, data de início e fim da quimioterapia, toxicidade a droga utilizada no tratamento, valores do marcador CA125 pré-cirúrgico; pós-cirúrgico e entre os seguimentos, recidivas por aumento de marcador ou diagnóstico por imagem, presença e padrão da recidiva, status no último segmento e estadiamento.

4.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA

As amostras de tecido a fresco disponíveis destes tumores foram resgatadas e extraídas pelo Laboratório de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center. As amostras selecionadas para o estudo passaram antes por uma revisão em cortes de hematoxilina e eosina (HE) para verificação da presença de tecido neoplásico. Todas as amostras utilizadas obtiveram 100% de presença de tecido neoplásico para extração.

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol®. Utilizou-se 1mL de Trizol para 50-100 mg de tecido e adicionados micro esferas magnéticos do kit do Precellys®. O excesso de Tissuetek® foi removido e o tecido cortado com bisturi transferindo-o para tubo com Trizol. As amostras foram processadas em três

diferentes etapas: centrifugação, lavagem e ressuspensão do precipitado seguido da quantificação no aparelho *NanoDrop* e verificação da integridade pelo *Bioanalyzer*. Ao final da reação, o RNA obtido foi armazenado em -80°.

A amostras foram tratadas com *turbo DNase free* (Life Technologies® CA, USA) antes de serem submetidas a técnica de perfil de expressão afim de remover possíveis restos de DNA.

O perfil de expressão gênica foi avaliado utilizando-se a plataforma *Whole Human Genome 4x44K* (Agilent Technologies®, USA) utilizando 100ng de material de RNA. Este método permite uma comparação direta da expressão de genes entre duas amostras diferentes, marcando-os com dois corantes fluorescentes diferentes e hibridando-os no mesmo *microarray*. Juntamente ao tecido tumoral, foi utilizado um RNA de referência universal (Agilent Technologies®, USA) estabelecendo na reação um mesmo denominador de análise dos dados.

Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção seguiram o protocolo *Two-color microarray-based gene expression analysis* (Agilent Technologies®, USA) que utiliza o *Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies® USA), figura 3 . Os procedimentos de hibridação e lavagem foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. As lâminas foram digitalizadas utilizando o scanner *DNA Microarray Scanner - G2565CA* (Agilent Technologies®, USA) e os dados brutos foram extraídos pelo programa *Feature Extraction* (v10.1.1.1) e normalizados quanto a sua fluorescência utilizando a normalização global dependente da intensidade (LOWESS). Com os dados devidamente normalizados, foi feita uma filtragem a fim de remover sondas com baixa reprodutibilidade restando assim somente alvos susceptíveis a análise. Para

esse passo foi utilizado o algoritmo LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) pelo pacote R.

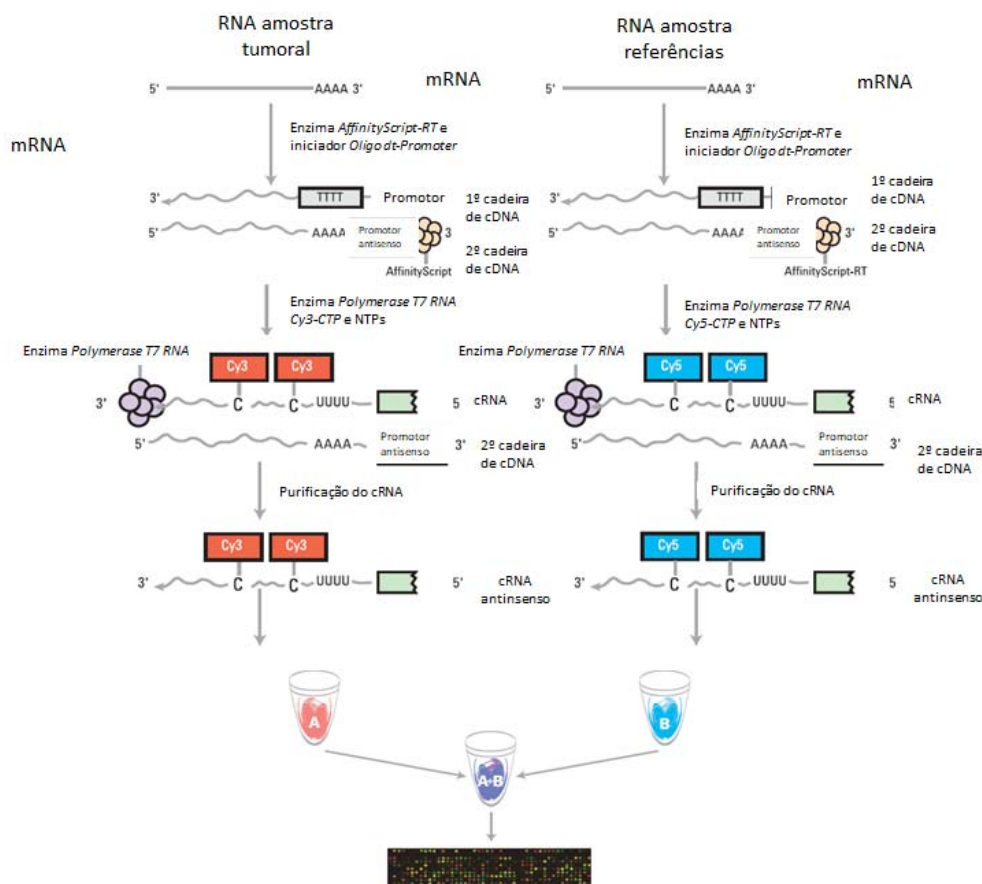


Figura 3 - Representação esquemática do método de hibridização

Para as análises gráficas, como construção do *heatmap* foi utilizado o programa TMeV v4.8 (www.tm4.org) para obtenção de perfil de expressão gênica e também para identificar genes diferencialmente expressos entre as amostras tumorais. A seleção dos genes significativos, que foi considerado com o $p \leq 0,05$, foi feita utilizando um valor limiar definido com relação ao *fold change*, onde ≥ 2.0 e $\leq -$

2.0 foram usados para classificar os genes mais e menos regulados, respectivamente, entre os dois grupos de comparação

4.4 ESCOLHA DOS GENES PARA VALIDAÇÃO

O estudo exploratório para genes diferencialmente expressos entre os dois grupos de pacientes contou com a ajuda de ferramentas para a análise funcional *in silico* a fim de obter a anotação das funções biológicas utilizando o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (v8.0 IPA, *Sistemas IngenuityH*, Redwood City, CA, EUA; <http://www.ingenuity.com>) onde foram identificados vias canônicas e redes de interações biológicas. Teste exato de Fischer foi aplicado para identificar as funções significativas, redes e vias representadas dentro dos respectivos conjuntos de genes.

Foi utilizado também o banco de dados públicos KOBAS 2.0 (XIE et al. 2011) - um servidor capaz de determinar anotação de funções e identificação de enriquecimento de vias e doenças, juntamente ao banco de dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), oriundo de um projeto que visou criar um atlas abrangente de perfis genômicos de diversos tipos de câncer.

Outro *software* utilizado para análise de predição dos dados foi o *Kaplan Meier plotter* (KMPlotter), usado para auxiliar na escolha dos genes para validação de acordo com o seu potencial em predizer tempo de sobrevida global e sobrevida livre de doença. Este utiliza dados de expressão genética e as informações de tempo de sobrevida são adquiridas dos bancos GEO (*Affirmicronic Microarrays Only*), EGA (*European Genome-phenome Archive*) e TCGA. O banco de dados é manipulado por um servidor *Postgre SQL*, que integra expressão gênica e dados

clínicos simultaneamente. Para analisar o valor prognóstico de um gene particular, as amostras dos pacientes são divididas em dois grupos (alta e baixa expressão de mRNA do marcador de acordo com a mediana). As duas coortes de doentes são comparadas por um gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier e calcula-se a razão de risco relativo com intervalos de confiança de 95% e valor de significância pelo teste de Log-Rank. Para essas análises, o banco disponibilizou de acordo com os critérios clínicos escolhidos, 269 amostras para a avaliação de sobrevida global e 251 amostras para sobrevida livre de doença em um tempo de acompanhamento de 250 meses.

Uma profunda busca na literatura pelos aspectos biológicos do tumor foi feita utilizando o servidor PubMed, a fim de distinguir e traçar a relevância dos achados com relação aos genes diferencialmente expressos encontrados.

4.5 PCR EM TEMPO REAL PARA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE MICROARRAY

Para a avaliação de reprodutibilidade dos dados através da quantificação precisa de transcritos identificados, a tecnologia de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é utilizada como uma técnica de apoio para validar e quantificar os genes escolhidos.

As onze amostras de RNA utilizadas no *microarray* foram transformadas em cDNA a partir de 2 µg do RNA total utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as especificações do fabricante. As qRT-PCR foram realizadas no aparelho Applied

Biosystems 7500HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystem) utilizando os iniciadores demonstrados no Quadro 3. Os ensaios foram realizados utilizando o sistema *SYBR® Green Master Mix* – (Lifetechnologies) seguindo as especificações do fabricante. Como controles endógenos foram testados *GAPDH* (gliceraldeído fosfato desidrogenase), *βACTIN* (beta actin) e *18S*.

Quadro 3 - Genes avaliados através de qRT-PCR e seus respectivos iniciadores

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>	Pares de base	Temperatura de <i>melting</i>
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	98	59,3
<i>BACTIN</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	102	62,4
<i>GAPDH</i>	AATCCCATCACCATCTTCCA	TGGACTCCACGACGTACTCA	95	61,9
<i>MMP14</i>	CTGCTCTCTTCTGGATGCCC	CATCGCTGCCCATGAATGAC	105	61,1
<i>PLCβ2</i>	CAGACAAGATGGCCCAGGAG	CTCCCGTATCTGTTCCAGGC	107	61,5
<i>PTDGS</i>	CTTCCTGCCCCAAACCGATA	GCAGAGACATCCAGAGCGTG	102	62,2

Os iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta do NCBI – *Primer Blast*, e conferidos para a formações de estruturas secundárias no *IDT OligoAnalyzer 3.1* (Integrated DNA Technologies). Para avaliação dos iniciadores foi feita uma PCR convencional, utilizando 2,0 µl de *buffer*; 0,6 µl de magnésio; 0,4 µl de dNTP's; 0,1 µl de enzima *Taq Polimerase*; 14,1 µl de água deionizada; 0,4 µl de iniciador *foward* e 0,4 µl de iniciador *reverse*. As amostras foram submetidas a uma temperatura inicial de desnaturação de 95° a 1 minuto seguidos de 37 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Foi adicionado uma extensão final de 10 minutos.

Para a otimização dos iniciadores foi feita uma alíquota e diluídos a 5µM variando as concentrações em 25µM, 50µM, 100µM, 200µM e 400µM utilizando a

concentração inicial das amostras a 10µg de cDNA. Para a escolha da melhor concentração do iniciador, foi analisada a curva de dissociação para cada par de iniciador tendo como ideal apresentar apenas um pico na sua análise gráfica, mostrando assim a especificidade do par de iniciador (menor concentração de iniciador que gera a máxima amplificação). Os valores estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de otimização da reação de PCR

Gene	Tamanho do <i>Amplicon</i>	<i>Slope</i>	Eficiência	Concentração utilizada
<i>PLCβ2</i>	155	-3,19	1,05	400nM
<i>MMP14</i>	165	-3,529	0,92	100nM
<i>PTDGS</i>	106	-3,451	0,95	200nM
<i>18S</i>	110	-3,529	0,92	25nM
<i>GAPDH</i>	107	-3,448	0,94	50nM
<i>BACTIN</i>	90	-3,309	1,00	100nM

Com a concentração dos iniciadores fixa, variou-se a concentração de cDNA afim de determinar os valores de *slope* (gradiente ou inclinação da curva) para calcular a eficiência do par de iniciador. Foi feito um gradiente de concentração de 100ng; 10ng; 1ng; 0,1ng e 0,01ng e analisado os valores de *slope* e correlação na curva de eficiência dos iniciadores, ajustando o limiar manualmente. Foi calculado o valor de eficiência pela formula:

$$[\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1].$$

As onze amostras utilizadas no ensaio de *microarray* foram então submetidas ao ensaio de qRT-PCR seguindo as respectivas concentrações e valores de eficiência dos iniciadores. Cada placa a ser avaliada contava com a amostra de RNA de referência e o endógeno que apresentou melhor valor de eficiência de acordo com a

fórmula acima. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e os valores de *ct* (*threshold cycle*) - considerado o número do ciclo de PCR no qual o nível de fluorescência atende ao limiar - foram submetidos a fórmula:

$$\frac{\text{Valor da Eficiência}^{\text{alvo (ct controle - ct amostra)}}}{\text{Valor da Eficiência}^{\text{endógeno (ct controle - ct endógeno)}}}$$

Os dados das curvas de reação e valores de *ct* foram coletados com a ajuda do *software* 7500 v2.0.6. (PFAFFL 2001)

4.6 CONFEÇÃO DE LÂMINAS DE MICRO ARRANJO EM MATRIZ DE TECIDOS (TISSUE *MICROARRAY* – TMA)

Além dos casos selecionados para o estudo de expressão gênica em larga escala, foram coletados 228 laudos de anatomopatológico com suas respectivas lamina de HE do banco de dados já previamente coletado pela equipe de Oncologia A.C. Camargo. As amostras foram revisadas com a ajuda da patologista Louise De Brot do departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. Os parâmetros anatomopatológicos revisados para o estudo incluíram: histologia, grau, acometimento bilateral, comprometimento da superfície ovariana, invasões vascular e linfática, necrose e índice mitótico. Aqueles que não apresentavam material suficiente foram excluídos da construção do TMA.

Após a revisão dos casos, 175 amostras foram selecionadas para compor o grupo de amostras de tumores primário. Destes, 114 pacientes compunham o grupo

de adenocarcinoma serosos de alto grau.

As malignidades classificadas como adenocarcinoma de ovário podem ter como um sítio primário o epitélio do ovário, o próprio peritônio (adenocarcinoma peritoneal primário) ou a tuba uterina. Eles são histologicamente e clinicamente semelhantes e são tratados da mesma forma (Halkia, Spiliotis, and Sugarbaker 2012) justificando assim a avaliação dos tecidos tumorais provenientes tanto de ovário quanto de peritônio.

Como os TMAs examinam apenas uma fração do tumor que é analisado usando métodos tradicionais, estudos geraram a preocupação com o fato de que a área avaliada no TMA não corresponda adequadamente à expressão de marcadores que exibem heterogeneidade de tecido. Pequenas séries de testes podem ser aplicadas e a heterogeneidade pode ser avaliada usando testes de correlações dos pontos correspondentes. Para analisar a reprodutibilidade dos anticorpos e avaliar a heterogeneidade tumoral, 28 amostras foram realizadas em duplicidade, de distintos locais de acometimento, pertencentes ao mesmo laudo anátomo patológico.

A área tumoral foi identificada no bloco de parafina doador, e puncionada com agulha de 1mm e os cilindros transferidos para o bloco receptor. As amostras foram inseridas em duplicata com espaço de 0,2 mm entre as amostras nos respectivos blocos. Juntamente, um mapa com a identificação detalhada de cada caso foi criado para posterior localização destes. Foram realizados cortes sequenciais de 3µm de espessura e coletadas em lâminas Starfrost® para a construção de TMA (*Instrumedics, Hackensack NJ - EUA*).

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A padronização dos anticorpos foi realizada em tecidos onde a sua expressão é previamente conhecida, pareando as análises com o tecido normal e tecido tumoral de interesse. Para as análises, foram realizados cortes de 4µm de espessura do bloco receptor utilizando um micrótomo (Leica®) e aderidos a lâminas carregadas positivamente (*Superfrost Plus*) e mantidos em estufa a 60°C *overnight*, a fim de facilitar a remoção da parafina.

As reações foram realizadas de forma automatizada no equipamento BenchMark XT (*Ventana Medical Systems*) utilizando o Kit *ultraView* Universal DAB-Ventana e *OptiView DAB Detection Kit* para os anticorpos primários policlonais PGD2 (Santa Cruz Biotech) e MM14 (Abgent), respectivamente (Quadro 4). A aplicação dos anticorpos foi feita manualmente e ambos utilizando a diluição de 1:100. Foi utilizada como controle negativo a omissão do anticorpo primário. Finalizada a reação, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film).

Quadro 4 - Reação de imuno-histoquímica para os anticorpos MMP14 e PGD2

Anticorpo	Fabricante	Controle positivo	Diluição	Kit de detecção	Recuperação Antigênica	Tempo de Incubação
MMP14	Abgent	Tuba uterina	1:100	OptiView DAB IHC Detection	60 min a 37° ↑ph	30 mim a 37°
PGD2	Santa Cruz	Cortex Cerebral	1:100	UltraView Universal DAB	30 min a 37° ↑ph	30 mim a 37°

4.8 ANÁLISES PROTEICA E DETERMINAÇÃO DA PONTUAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA IHQ

Para PGD2 onde a marcação foi considerada clara e consistente foi feita a análise manual, considerado positivo quando estes apresentavam um padrão de marcação citoplasmático nítido e bem localizada. Os níveis de expressão citoplasmática foram representados pela porcentagem de células positivas e a intensidade de marcação, seguindo a fórmula $HScore = \Sigma(\text{porcentagem de células positivas} \times \text{intensidade de marcação})$. A porcentagem de células marcadas variou de 0 a 100%, e intensidade de marcação variou entre 0 (ausência de marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte), podendo classificar o HScore de 0 a 300 (ALVARENGA et al. 2013). Para realização da estatística descritiva, testes de associação e sobrevida, foi feita uma divisão entre amostras que tiveram expressão negativa a fraca (valores de Hscore 0 – 100) e expressão moderada a forte (Hscore 200 – 300)

Para MMP14 que se apresentou em níveis de intensidade inconclusivos e com difícil score manual, optou-se pela análise automatizada que tornasse a interpretação direta e objetiva, utilizado a ferramenta *Visiopharm* (Copenhagan, Denmark). O *software* analisou todas as áreas do TMA de forma continua diferenciando as áreas tumorais do estroma tecidual e pontuando ambas. A identificação automática de tecido tumoral e estromal foi realizada utilizando um classificador *K-means*, utilizado principalmente para segmentação de cores, classificação e visualização de imagens como parte da representação em um mapa de intensidade. Após a

identificação das áreas de interesse, o processamento foi realizado para remover pequenos objetos e interferentes usando um limiar simples.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O pacote LIMMA foi usado para a obtenção de genes diferencialmente expressos e a comparação estatística entre os grupos de tumores na análise pelo *microarray* foi feita utilizando o pacote R para modelagem e testes estatísticos, considerando valor de $P < 0,05$ significativo. Esse valor foi submetido ao teste de correção de *Bonferroni* para comparações múltiplas

Para os valores numéricos tanto de *microarray* quanto de qRT-PCR foram utilizados o teste de *Kolmogorov–Smirnov* para avaliação de distribuição normal antes da correlação dos valores. Correlação de *Pearson* e *Spearman* foi usada àqueles com distribuição normal, e não normal, respectivamente.

Para a análise estatística entre dados de expressão de mRNA, expressão proteica, variáveis demográficas e anatomopatológicos foi usado o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), para Windows, versão 22.0 e os gráficos foram construídos através do programa *GraphPad Prism*, versão 5.0.

O teste de Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher foram usados para verificar a associação entre variáveis categóricas e dados clínico-patológicos. Para verificar a associação entre variáveis numéricas e variáveis categóricas (dados clínico-patológicos), foi usado o teste de Mann-Whitney e Kruskal–Wallis. Para a comparação de dois grupos foi usando o teste t de *Student*, já para comparações múltiplas foi utilizado o teste ANOVA com correção de *Bonferroni*.

As curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença foram feitas pelo método de Kaplan-Meier, utilizando 5 anos de acompanhamento e a comparação das diferenças entre as curvas foi feita pelo teste de significância de Log-Rank. O ponto de corte utilizado para as variáveis numéricas foi determinado pela maximização da estatística Log-Rank (LAUSEN e SCHUMACHER 1992).

A análise multivariada foi utilizada para a predição do impacto combinado de variáveis independentes na sobrevida usando o modelo de regressão de Cox com riscos proporcionais. Todas as variáveis com valor $p < 0,20$ na análise univariada foram inseridas na análise multivariada (HARRELL 1996). Para todos os testes realizados, foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. (LAUSEN e BIOMETRY 1992)

5 RESULTADOS

Dentre as 208 amostras de tecido a fresco disponíveis no Biobanco da instituição, 11 se encaixaram nos fatores de inclusão para o grupo de análise. As onze pacientes que compunham esse grupo de análise tinham uma mediana de idade de 52 anos (mínimo 42 – máximo 68), onde 3 amostras correspondiam ao grupo de pacientes não recidivadas (27,3%) e 8 (72,7%) ao grupo de pacientes recidivadas

Para comparar os conjuntos de dados de *microarrays* obtidos neste grupo uniforme de amostras de tumores, comparamos os padrões de expressão gênica entre pacientes sem recorrência da doença após 2 anos do último tratamento de platina, considerados como "respondedores" e pacientes com recorrência dentro de 2 anos a partir da última infusão de platina, considerado como "não respondedoras".

Obtivemos um total de 1149 genes diferencialmente expressos, considerando um *fold change* com diferença $\leq |2|$. Estabelecido esse ponto de corte tivemos um total 818 genes hipo-expressos e 331 genes hiper-expressos quando comparados amostras de pacientes recidivadas e não recidivadas. A figura 4 mostra o agrupamento hierárquico e a medida de distância calculada usando a distância euclidiana, representando graficamente os dados em que os valores individuais contidos em uma matriz são representados em cores (*heatmap*). As medições do *microarray* podem ser organizadas em uma matriz de *heatmap*, onde a linha representa as amostras analisadas e as colunas os genes encontrados. O nível de expressão é visualizado através de cores, onde o verde simboliza genes hipo-expressos e vermelho hiper-expressos. A leitura da figura pode agregar visualmente a

determinação da relevância da análise, sendo possível detectar um padrão de distribuição dos dados de acordo com a comparação proposta.

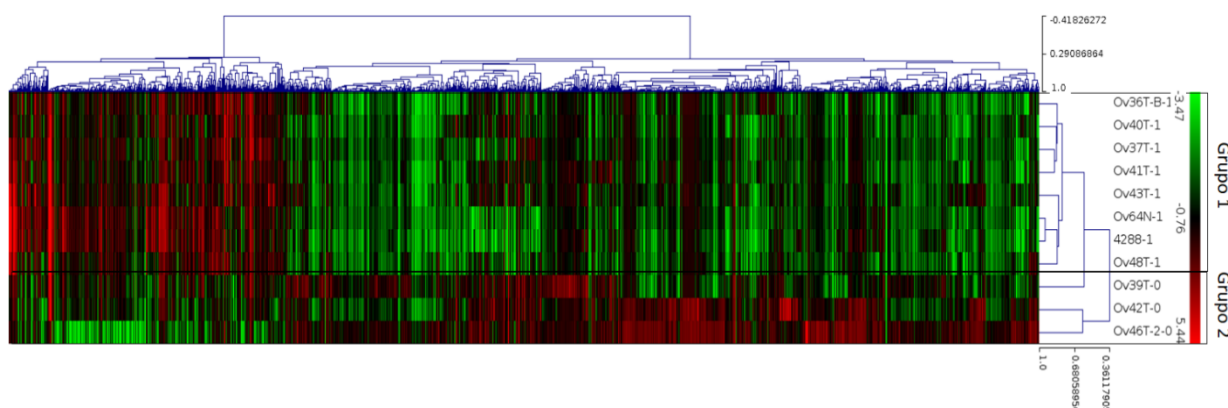


Figura 4 - Cluster dos 1149 genes pela distância euclidiana. Os genes detectados em amostras de pacientes que tiveram a recorrência da doença em dois anos estão representados pelas amostras do Grupo1, comparados com pacientes livres da doença (Grupo 2) mostrando uma ligeira tendência de agrupamento juntamente com uma tendência visual para o maior número de genes hiper-regulados nesse mesmo grupo.

A fim de comparar nossos resultados obtidos por *microarray* foram extraídos dados obtidos de um estudo do TCGA utilizando RNAseq, que contou com 193 amostras que apresentaram tempo de seguimento de dois anos finalizados em 2015, capaz de classifica-las quanto a resposta clínica (onde 153 das pacientes não apresentaram recidiva em 2 anos de seguimento e 40 pacientes apresentaram recidiva). Esse grupo de análise gerou uma lista com 219 genes diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) com um valor limiar de *fold change*, onde $\geq 1,5$ e $\leq -1,5$ foram usados para classificar os genes mais e menos regulados, respectivamente.

Foram encontrados 133 genes hipo-regulados e 86 hiper-regulados e ao compilar os dados das duas plataformas os genes *CD109*, *DDX43*, *FILIP1*, *KCNQ2*,

MRAP2, *POF1B*, *PRSSI*, *SP5*, *ZNF208* foram comuns às plataformas com seis desses genes exibindo o mesmo perfil de expressão gênica em ambos os resultados.

Tabela 4:

Tabela 4 - Lista de genes em comum entre os resultados de *microarray* e o banco de dados do TCGA.

Gene	Microarray				TCGA			
	Grupo 1 ^a	Grupo 2 ^b	Fold Change	Valor de p	Grupo 1 ^a	Grupo 2 ^b	Fold Change	Valor de p
<i>CD109</i> *	-0,83	1,94	-2,17	0,04	-0,21	0,39	-1,52	0,024
<i>DDX43</i> *	-0,09	-1,7	-3,05	0,008	-2,69	-1,76	-1,91	0,006
<i>FILIP1</i> *	-0,47	-1,38	-1,88	0,035	0,49	1,20	-1,64	0,015
<i>KCNQ2</i>	1,2	-0,3	-2,84	0,012	-0,17	-0,88	1,64	0,007
<i>MRAP2</i> *	-0,42	-2,39	-3,94	0,000	0,34	1,20	-1,81	0,009
<i>POF1B</i> *	0,73	-0,29	-2,03	0,034	-1,63	-0,54	-2,13	0,017
<i>PRSSI</i>	-1,3	0,3	2,52	0,034	3,93	4,84	-1,88	0,018
<i>SP5</i>	1,25	2,64	2,62	0,027	0,83	1,56	-1,66	0,040
<i>ZNF208</i> *	0,57	-1,27	-3,59	0,010	1,16	2,21	-2,06	0,012

^aGrupo 1: Média do grupo de pacientes não respondedoras, ^b Grupo 2: Média do grupo de pacientes respondedoras * Genes exibindo o mesmo perfil de expressão gênica em ambas as plataformas. Significância estatística, $P \leq 0.05$. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste Log-Rank.

A análise de enriquecimento realizada com o uso do software IPA permitiu identificar os principais moduladores de genes que foram significativamente hiper-expressos e hipo-expressos ($p < 0,05$) entre a análise de pacientes respondedoras ou não a quimioterapia (tabela 5). De acordo com a análise utilizando esse *software*, as vias de sinalização associadas ao câncer foram encontradas com alta significância estatística em ambas as análises ($p < 0,001$).

Tabela 5 - Lista dos principais genes moduladores da comparação entre pacientes respondedoras e não respondedoras identificados usando o *software* IPA e taxas de sobrevida do *software* *KMplotter*.

Gene	Localização Cromossomal	Fold change Grupo 1 ^a	Fold change Grupo 2 ^b	Microarray	KMPlotter				
					Valor de p	Taxa de risco relativo para morte (95% IC)	Valor de p	Taxa de risco relativo para recorrência (95% IC)	Valor de p
<i>RPA4</i>	chrX:96026928-96026987	5,09	1,00	17,09	0,007	1,08 (0,76 - 1,51)	0,6781	1,2 (0,87 - 1,67)	0,2726
<i>COX17</i>	chr3:120878446-120876759	4,24	0,57	12,71	0,007	1,03 (0,73 - 1,45)	0,8796	1,08 (0,78 - 1,51)	0,6271
<i>MMP14</i>	chr14:22385631-22385690	2,23	-0,74	7,84	0,003	0,61 (0,43 - 0,87)	0,0056	0,69 (0,49 - 0,96)	0,0264
<i>PAX8</i>	chr2:113691555-113691496	2,21	-0,47	6,44	<0,001	0,69 (0,49 - 0,98)	0,0353	0,74 (0,53 - 1,03)	0,0774
<i>WFDC2</i>	chr20:43532492-43532551	5,29	3,22	4,22	0,007	1,11 (0,78 - 1,56)	0,5656	0,96 (0,69 - 1,34)	0,8194
<i>SYT12</i>	chr11:66574795-66574854	0,83	-1,27	4,28	0,006	1,16 (0,82 - 1,64)	0,3941	0,89 (0,64 - 1,24)	0,5038
<i>TJP1</i>	chr15:27781176-27781117	1,73	-0,83	5,91	0,004	1,14 (0,81 - 1,61)	0,4544	1,22 (0,88 - 1,7)	0,2306
<i>CEMIP</i>	chr15:79030858-79030917	-0,61	-3,22	6,09	<0,001	NA	NA	NA	NA
<i>PTGDS</i>	chr9:138995951-138996010	4,3	1,63	6,37	0,008	1,08 (0,77 - 1,53)	0,645	1,5 (1,08 - 2,09)	0,0146
<i>FAM81A</i>	chr15:57602093-57602152	-1,45	1,62	-8,40	0,002	NA	NA	NA	NA
<i>STX18</i>	chr4:4510103-4509879	-1,4	1,63	-8,15	0,002	0,99 (0,7 - 1,4)	0,9472	0,93 (0,67 - 1,29)	0,6564
<i>RASL11B</i>	chr4:53427599-53427659	-0,36	2,64	-8,00	0,001	0,72 (0,51 - 1,02)	0,0671	0,8 (0,58 - 1,11)	0,1847
<i>PTN</i>	chr7:136563283-136563224	-1,7	1,11	-7,01	0,009	0,94 (0,67 - 1,32)	0,7223	1,42 (1,02 - 1,98)	0,0363
<i>USP45</i>	chr6:100037403-100037344	-1,97	0,77	-6,68	0,001	NA	NA	NA	NA
<i>RASA2</i>	chr3:142811003-142811415	-1,32	1,37	-6,44	0,001	NA	NA	NA	NA
<i>DAPK1</i>	chr9:89444210-89444525	-0,91	1,71	-6,15	0,002	1,16 (0,82 - 1,64)	0,3962	1,08 (0,77 - 1,49)	0,6622
<i>ZNF516</i>	chr18:72199296-72199237	-2,4	0,16	-5,89	0,001	0,87 (0,62 - 1,22)	0,4125	0,96 (0,69 - 1,33)	0,8065
<i>CADPS</i>	chr3:62359875-62359816	-0,9	1,63	-5,80	0,006	NA	NA	NA	NA
<i>TFF2</i>	chr21:42640715-42639717	0,44	2,95	-5,68	0,003	0,99 (0,71 - 1,4)	0,9759	0,96 (0,69 - 1,33)	0,8029
<i>PLC82</i>	chr15:38369575-38368850	3,08	-0,22	9,87	0,025	0,78 (0,55 - 1,11)	0,165	0,82 (0,59 - 1,14)	0,2441

^aGrupo 1: Média do grupo de pacientes não respondedoras, ^bGrupo 2: Média do grupo de pacientes respondedoras, ND: Não disponível, IC: Intervalo de confiança

A comparação dos dados entre pacientes respondedoras e não respondedoras juntamente com o banco de dados KOBAS gerou 232 anotações de um conjunto de genes, vias e doenças relacionadas baseadas no mapeamento dos genes com funções conhecidas. A análise de enriquecimento realizada com o uso do *software* IPA pareada com a análise de enriquecimento do *software* KOBAS gerou 20 anotações de vias relacionadas aos mecanismos moleculares do câncer, dentre essas relacionamos mecanismos de divisão celular e sobrevivência, invasão, mecanismo de regulação, controle do crescimento, angiogênese e interação com o sistema imune (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação funcional in silico dos 1149 genes candidatos a moduladores realizada no *software* Ingenuity Pathways Analysis (IPA) pelo banco de dados público KOBAS.

Mecanismos Moleculares do Câncer				
	Via	database	ID	Valor de P
Divisão Celular e Sobrevida	Ciclo Celular	Reactome	REACT_111214	0.040
	Regulação da via de sinalização apoptótica extrínseca	Gene Ontology	GO:1902041	0.027
	Regulação da fase de execução da apoptose	Gene Ontology	GO:1900117	0.032
	Sinalização de p53	KEGG PATHWAY	hsa04115	0,04
	Receptor de TGF-beta sinalizando em TEM	Reactome	REACT_120726	0.019
Invasão	Regulação de migração celular	Gene Ontology	GO:0030334	0.006
	Adesão célula-matriz	Gene Ontology	GO:0007160	0.014
	Regulação do movimento celular	Gene Ontology	GO:0051270	0.024
	Organização de junção celular	Gene Ontology	GO:0034330	0.042
	Adesão focal	Gene Ontology	GO:0048041	0.047
Mecanismos de regulação	Transcrição do RNAm do promotor da RNA polimerase II	Gene Ontology	GO:0042789	0.017
	Ligação a drogas	Gene Ontology	GO:0008144	0.041
	Regulação positiva da importação de NF-kappaB no núcleo	Gene Ontology	GO:0042346	0.044
	Via de sinalização do Retículo endoplasmático	Gene Ontology	GO:0006984	0.049
	Regulação da importação de proteína SMAD no núcleo	Gene Ontology	GO:0060390	0.019
Controle do crescimento	Receptor de insulina	Gene Ontology	GO:0005158	0.011
	Resposta celular ao estímulo das gonadotropinas	Gene Ontology	GO:0071371	0.029
Angiogênese	Angiogênese envolvida no reparo	Gene Ontology	GO:0060055	0.019
	Regulação positiva da produção do fator de crescimento endotelial vascular	Gene Ontology	GO:0010575	0.044
Interação com sistema Imune	Migração de granulócitos	Gene Ontology	GO:0097530	0.027

Via de sinalização de p53, proteína supressora tumoral que está entre a mais comumente mutada nos cânceres humanos, juntamente com uma alta fração no adenocarcinoma seroso de alto grau (AHMED et al. 2010) aparece com um considerável valor estatístico nos nossos dados de análise pelo software IPA ($p=0,006$) descritos na Tabela 7, e pelo banco de dados KOBAS (caracterizado como sinalização de p53 pelo KEGG PATHWAY, $p=0,04$ e com 3 moléculas envolvidas). Metabolismo de lipídios, no qual ilustra o papel fundamental desempenhado pelos lipídios na manutenção da homeostase também foi uma função molecular vista alterada no *software* IPA ($p\leq 0,001$ com 15 moléculas envolvidas) e no banco de dados KOBAS (caracterizado como regulação do processo metabólico lipídico - Gene Ontology: 0019216, $p=0,03$ e com 8 moléculas envolvidas).

Tabela 7 - Doenças e funções biológicas obtidas através da análise de predição do *software* IPA.

Via canônicas	Valor de p	Ratio
Cetogênese	0,00595	2/10 (0.2)
Sinalização de p53	0,00633	5/98 (0.051)
Mevalonato	0,0101	2/13 (0.154)
Biossíntese do cofator de tio-molibdênio	0,0119	1/1 (1)
Mecanismos Moleculares do Câncer	0,0124	10/365 (0.027)
Doenças e desordens	Valor de p	Moléculas
Câncer	<0,001	207
Doença gastrointestinal	<0,001	146
Doenças do tecido conjuntivo	<0,001	19
Transtorno do Desenvolvimento	<0,001	39
Doenças Neurológicas	<0,001	35
Funções Molecular e celular	Valor de p	Moléculas
Replicação do DNA, recombinação e reparo	<0,001	14
Morfologia celular	<0,001	34
Produção de Energia	<0,001	8
Metabolismo lipídico	<0,001	15
Bioquímica das pequenas moléculas	<0,001	29
Principais Redes de Efeitos Reguladores	Score	
Desenvolvimento Celular, Crescimento e Proliferação	43	
Celulares, Transtornos do Tecido Conjuntivo		
Desenvolvimento Tecidual, Lesão Organística e Anormalidades, Insuficiência Renal	34	
Ciclo Celular, Movimento Celular, Transtorno do Desenvolvimento	30	
Replicação, Recombinação e Reparação de DNA, Metabolismo de Ácido Nucleico, Bioquímica de Pequenas Moléculas	27	
Doença Cardiovascular, Lesão Organística e Anormalidades, Doenças do Sistema Reprodutivo	27	

A análise *in silico* de rede de interação envolvendo possíveis *drivers* pelo *software* IPA foi capaz de mostrar alguns dos moduladores selecionados interligados com *AKT* como modulador central. *AKT* regulou positivamente *PEAI5*, *MMP14*, *TJPI*, e negativamente *SRF*. Dessa forma, *AKT* e seus parceiros de interação modulam diversos processos celulares como adesão célula a célula (*PEAI5*), matriz extracelular (*MMP14*), morte celular (*TJPI*), diferenciação e proliferação (*SRF*). *AKT* é conhecido por desempenhar um papel fundamental em múltiplos processos celulares apoptose, proliferação celular, transcrição e migração celular

(ALTOMARE e TESTA 2005) aparece como figura central de 35 genes, entre eles hiper-expressos e hipo-expressos. (Figura 5)

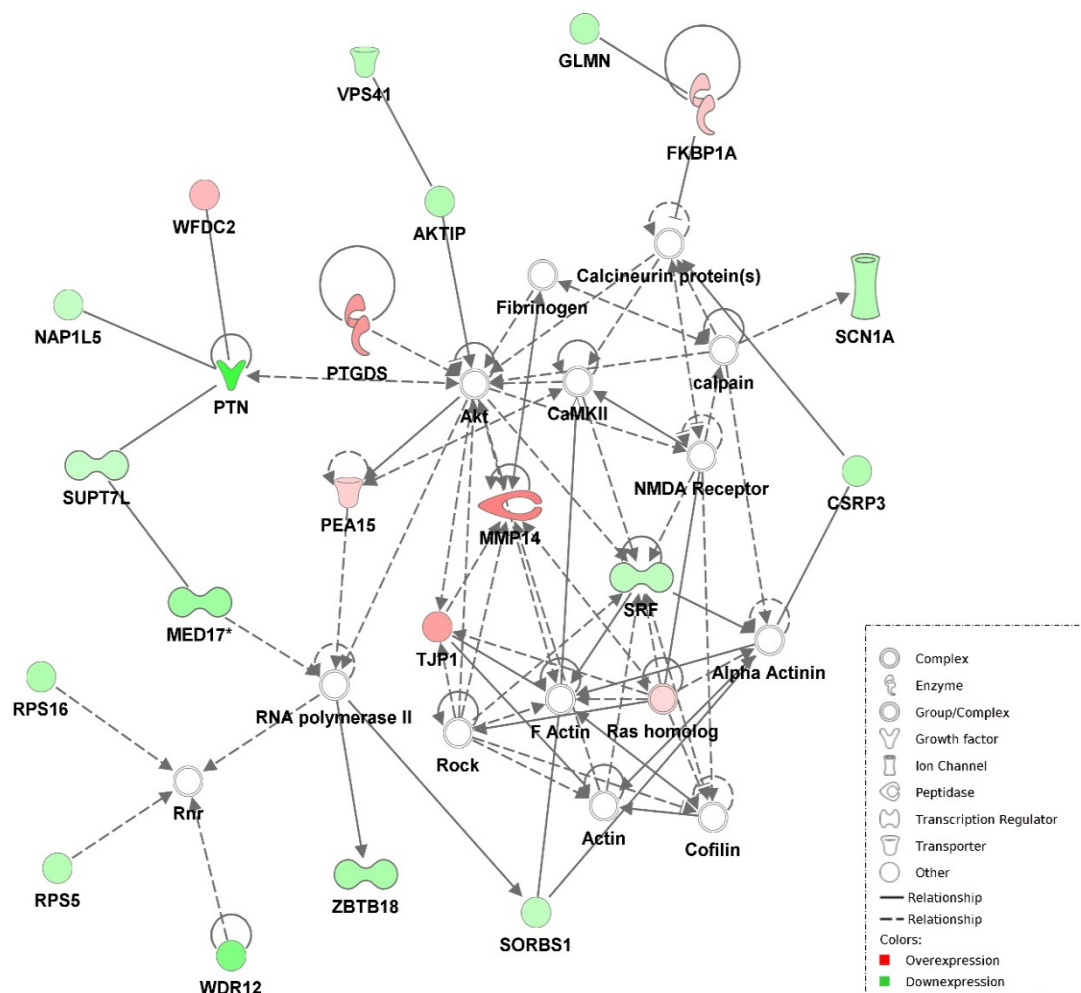


Figura 5 - Rede interativa gerada pelo *software* IPA. Base na assinatura gênica dos genes diferencialmente expressos.

Sendo assim, foram escolhidos três genes para validação por qRT-PCR levando em consideração análises *in silico* pelo *software* IPA, *KMPlotter*, bancos de dados do TCGA e KOBAS, juntamente a uma busca acurada pela literatura e o papel biológico desses genes no contexto do câncer de ovário: *MMP14*, *PLCβ2* e *PTGDS*.

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR

Para a avaliação da reprodutibilidade dos dados através da quantificação precisa de transcritos identificados, a tecnologia de qRT-PCR é utilizada como técnica para validar e quantificar os genes escolhidos. Para o implemento das assinaturas genômicas em ensaios na pesquisa básica a técnica de escolha é a qRT-PCR, considerada o padrão ouro na análise de expressão gênica (QIN et al. 2006).

Os valores de *fold change* foram extraídos de cada amostra tanto do ensaio de *microarray* quanto do qRT-PCR afim de avaliar a correlação entre os valores obtidos pelas duas técnicas. Primeiramente os dados numéricos foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de *Kolmogorov–Smirnov*. Os valores de *MMP14* apresentaram distribuição normal dos seus valores e foram submetidos ao teste paramétrico (correlação de *Pearson*) já os genes, *PLCβ2* e *PTGDS*, foram submetidos ao teste não-paramétrico (correlação de *Spearman*), visto que esses apresentaram distribuição não normal (tabela 8).

Tabela 8 - Correlação entre os valores de *microarray* e qRT-PCR e seus respectivos valores estatísticos.

Gene	<i>Fold change</i> Grupo1	<i>Fold change</i> Grupo 2	Teste	IC 95%	Correlação	Valor de p
<i>MMP14</i>	1.05	-3.42	<i>Person</i>	0.04021 a 0.8909	0,625	0,040
<i>PLCβ2</i>	2.71	-0.41	<i>Spearman</i>	-0.4404 a 0.7418	0,236	0,484
<i>PTGDS</i>	6.15	1.6	<i>Spearman</i>	0.7908 a 0.9866	0,945	<0,001

^aGrupo 1: Média do grupo de pacientes não respondedoras, ^b Grupo 2: Média do grupo de pacientes respondedoras IC: Intervalo de confiança

Apesar do gene *PLC β 2* apresentar o mesmo perfil de expressão nas reações de *microarray* e qRT-PCR (Figura 6), obtivemos somente valores de correlação das técnicas nos genes *MMP14* ($r=0,625$; 0,04) e *PTGDS* ($r=0,945$; $<0,001$).

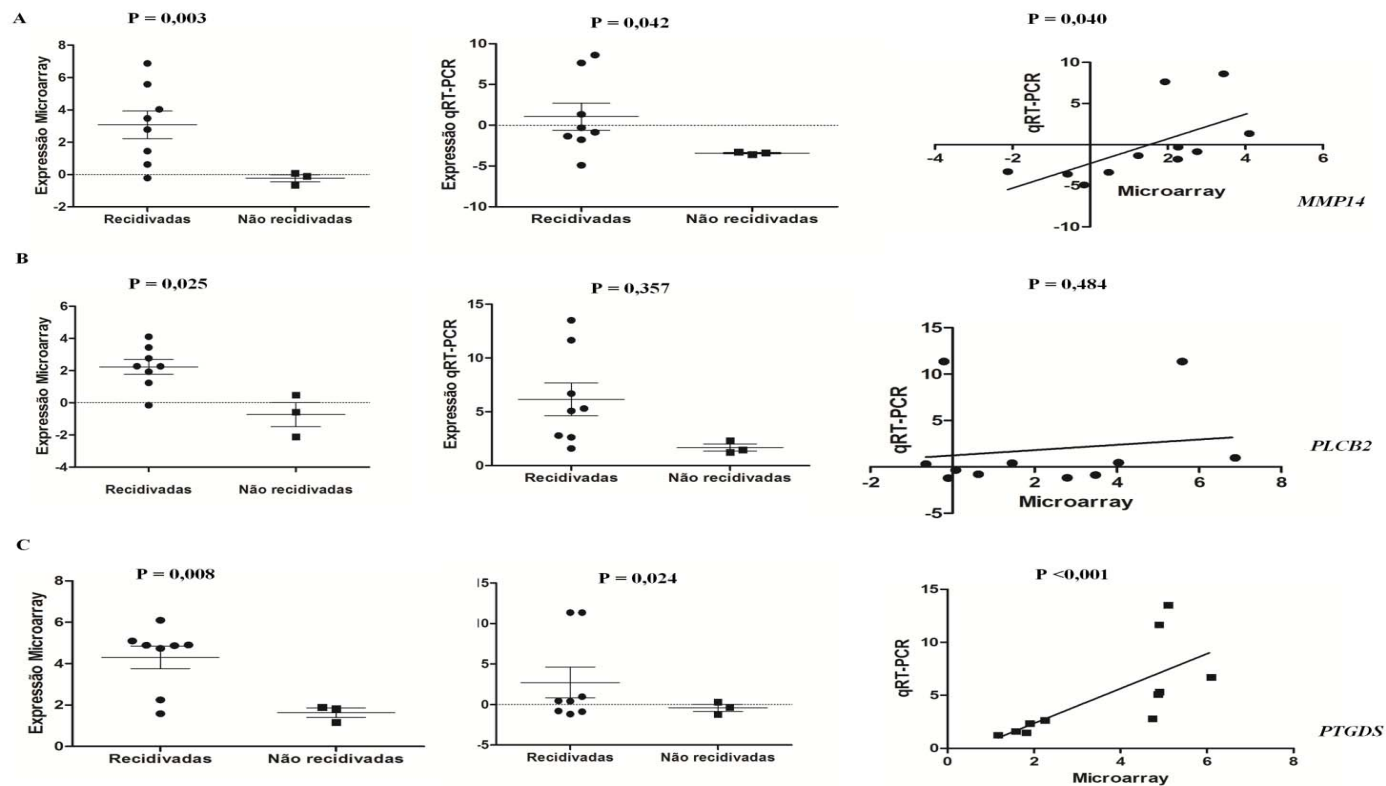


Figura 6 - Análise de expressão gênica através das técnicas de *microarray* e qRT-PCR dos transcritos selecionados e avaliados por *Sybr green* e a correlação entre as duas técnicas. **A** correspondendo ao gene *MMP14*, **B** correspondendo ao gene *PLC β 2* e **C** correspondendo ao gene *PTGDS*

5.2 IMUNO-HISTOQUIMICA

A avaliação proteica foi conduzida em uma casuística maior, contendo 114 casos, todos classificados histologicamente em adenocarcinomas serosos de alto grau.

5.2.1 Caracterização da amostra utilizada na avaliação proteica

Foram avaliadas 114 amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de ovário com idade mediana de 59 anos (mínimo de 33 anos e máximo de 82). Destas, 97 (88,2%) pacientes foram diagnosticadas em estágios avançados da doença (III-IV). Status desempenho das pacientes (n = 89) foi dividido em dois grupos (pacientes com pontuação de 0 vs pacientes com pontuação 1,2 e 3). Obtivemos informação de dosagem sérica do antígeno CA125 de 91 pacientes, com o valor de mediana de 738.

A maioria das pacientes (91/114) compondo 80.5% da casuística tiveram recidiva da doença (pertencentes ao grupo de não respondedoras) e 64 (56,1%) vieram a óbito pela doença. De acordo com os parâmetros anatomopatológicos avaliados para o estadiamento da doença, presença de invasão vascular linfática foi observada em 47 (66.2%), acometimento bilateral da doença ovariana em 52 das pacientes (76.5%), 64 de 68 pacientes (94.1%) apresentaram comprometimento da capsula ovariana e 56.7% das pacientes apresentaram metástase linfonodal (38/67). Com relação a resposta clínica, o grupo de pacientes classificadas como resistentes a quimioterapia de acordo com a última infusão de platina compunha 28% da nossa casuística (30/107). A Tabela 9 mostra os dados anatomopatológicos de forma resumida.

Tabela 9 - Dados clínico-patológicos dos 114 pacientes com carcinomas serosos de alto grau analisados em amostras arquivadas em parafina.

Variáveis clínico-patológicas	Categoria	N/Total (%)
Invasão vascular linfática	Não	24/71 (33,8)
	Sim	47/71 (66,2)
Invasão vascular sanguínea	Não	59/71 (83,10)
	Sim	12/71 (16,9)
Acometimento bilateral	Não	16/68 (23,5)
	Sim	52/68 (76,5)
Necrose	Presente	27/87 (31)
	Ausente	60/87 (69)
Comprometimento da superfície ovariana	Não	4/68 (5,9)
	Sim	64/68 (94,1)
Metástase linfonodal	Não	29/67 (43,3)
	Sim	38/67 (56,7)
Cirurgia	Primaria	83/114 (72,8)
	Intervalo	31/114 (27,2)
Volume de doença residual	Ótima	66/99 (66,7)
	Subótima	33/99 (33,3)
Estadiamento	I/II	13/110 (11,8)
	III/IV	97/110 (88,2)
CA125 pré-operatório	<738	46 (50,5)
	>738	45 (49,5)
Status desempenho	0	40/89 (44,9)
	1.2.3	49/89 (55,1)
Quimioterapia	Neoadjuvante	77/101 (76,2)
	Adjuvante	24/101 (23,8)
Óbito	Não	50/114 (43,9)
	Sim	64/114 (56,1)
Recidiva	Não	22/113 (19,5)
	Sim	91/113 (80,5)
Resposta à quimioterapia	Platina Resistente	30/107 (28)
	Platina Parcialmente Sensível	20/107 (18,7)
	Platina Sensível	20/107 (18,7)
	Não recidivada	37/107 (34,6)

Os dados clínicos e parâmetros anatomopatológicos foram submetidos à análise univariada de sobrevida global e livre de doença. Na sobrevida global, cirurgia primária apresentou uma diferença entre as curvas pela análise de Kaplan-Meier, e o teste de Log Rank confirmou uma diferença significativa entre elas ($p = 0,003$). O volume de doença residual após cirurgia também apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas para sobrevida global e sobrevida livre de doença ($p < 0,001$; ambas). Os demais dados clínicos e anatomopatológicos se encontram resumidos na Tabela 10. Pelo modelo de regressão de Cox calculamos as taxas de risco relativo das pacientes e variáveis clínico patológicas com relação ao tempo de sobrevida global e livre de doença. Os valores de taxa de risco relativo das variáveis clínico patológicas e intervalos de confiança estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 10 - Sobrevida global e livre de doença dos dados clínicos e anatomopatológicos

Variáveis	Categoria	Sobrevida Global			Sobrevida Livre de doença		
		N de pacientes	Taxa de sobrevida (%)	Valor de p	N de pacientes	Taxa de sobrevida (%)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	24	50	0,681	24	25	0,566
	Sim	47	57.4		47	17	
Invasão vascular sanguínea	Não	59	52.5	0,563	59	18.6	0,605
	Sim	12	66.7		12	25	
Acometimento bilateral	Não	16	50	0,768	16	18.8	0,942
	Sim	52	57		52	21.2	
Necrose	Não	27	48.1	0,454	27	22.2	0,601
	Sim	60	51.7		60	18.3	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	4	50	0,968	4	25	0,441
	Sim	64	54.7		64	18.8	
Metástase linfonodal	Não	29	51.7	0,932	29	24.1	0,305
	Sim	38	60.5		38	18.4	
Cirurgia	Primaria	83	55.4	0,003*	82	20.7	0,077
	Intervalo	31	32.3		30	16.7	
Volume de doença residual	Ótima	66	59.1	<0,001*	66	21.2	<0,001*
	Subótima	33	27.3		33	6.1	
Estadiamento	I-II	13	61.5	0,201	13	38.5	0,034*
	III-IV	97	46.4		96	16.7	
CA125 pré-operatório	<738	46	54.3	0,086	46	21.7	0,105
	>738	45	42.2		44	15.9	
Idade	<59	55	58.2	0,072	55	18.2	0,409
	>59	59	44.1		57	21.1	
Status desempenho	0	40	67.5	<0,001*	40	20	0,047*
	1,2,3	49	28.6		48	16.7	
Quimioterapia	Adjuvante	77	50.6	0,113	77	18.2	0,005*
	Neoadjuvante	24	37.5		23	8.7	

Cont/ Tabela 10

Variáveis	Categoria	Sobrevida Global			Sobrevida Livre de doença		
		N de pacientes	Taxa de sobrevida (%)	Valor de p	N de pacientes	Taxa de sobrevida (%)	Valor de p
Resposta clinica a quimioterapia	Resistente	30	13.3	<0,001*	29	0	<0,001*
	Parcialmente sensíveis	20	30		20	5	
	Sensíveis	20	60		20	0	
	Não recidivadas	37	86.5		37	45.9	
MMP14 citoplasmático ^a	<163	50	38	0.099	49	20.4	0.189
	>163	55	58.2		54	22.2	
MMP14 estromal ^a	<78	55	45.5	0,712	54	20.4	0,788
	>78	47	55.3		46	23.9	
PGD2 ^b	Presença	84	52.4	0,071	84	25	0,009*
	Ausência	22	31.8		21	4.8	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste Log-Rank. ^a Os valores de mediana da avaliação de MMP14 no citoplasma tumoral e estroma tumoral são usados aqui para criação de dois grupos de análises. ^b Valores de expressão negativo a fraco de PGD2 e expressão moderada e forte foram utilizados para criação de dois grupos de análises.

Tabela 11 - Taxa de risco relativo e seus respectivos intervalos de confiança para morte e recorrência da doença.

Variável		Taxa de risco relativo para morte (95% IC)	Valor de p	Taxa de risco relativo para recorrência (95% IC)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	1	0,68	1	0,57
	Sim	0,86 (0,42 - 1,76)		1,17 (0,67 - 2,05)	
Invasão vascular sanguínea	Não	1	0,56	1	0,61
	Sim	0,73 (0,25 - 2,10)		0,83 (0,40 - 1,69)	
Acometimento bilateral	Não	1	0,77	1	0,94
	Sim	0,88 (0,39 - 1,99)		0,97 (0,52 - 1,82)	
Necrose	Não	1	0,45	1	0,6
	Sim	0,78 (0,41 - 1,48)		1,14 (0,68 - 1,91)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	1	0,96	1	0,45
	Sim	0,97 (0,23 - 4,07)		1,56 (0,48 - 5,03)	
Metástase linfonodal	Não	1	0,93	1	0,31
	Sim	0,96 (0,46 - 2,01)		1,32 (0,76 - 2,30)	
Cirurgia	Primaria	1	0,004*	1	0,08
	Intervalo	2,19 (1,27 - 3,76)		1,50 (0,94 - 2,39)	
Volume de doença residual	Otima	1	<0,001*	1	<0,001*
	Subotima	1,76 (1,33 - 2,34)		1,54 (1,22 - 1,93)	
Estadiamento	I-II	1	0,21	1	0,04*
	III-IV	1,79 (0,71 - 4,49)		2,13 (1,02 - 4,41)	
CA125 pre operatorio ^a		1 (1 - 1)	0,905	1 (1 - 1)	0,361
Idade ^a		1,02 (0,99 - 1,04)	0,128	1,00 (0,98 - 1,02)	0,872
Status desempenho	0	1	<0,001*	1	0,05*
	1,2,3	3,38 (1,78 - 6,44)		1,58 (0,99 - 2,53)	
Quimioterapia	Adjuvante	1	0,12	1	0,007*
	Neoadjuvante	1,60 (0,88 - 2,92)		1,99 (1,20 - 3,29)	
Resposta clinica a quimioterapia	PR	1	<0,001*	1	<0,001*
	PS	0,39 (0,30 - 0,52)		0,13 (0,08 - 0,198)	
PGD2	Presença	1	0,07	1	0,01*
	Ausência	0,58 (0,32 - 1,06)		0,52 (0,31 - 0,86)	
MMP14 Eptelial ^a		0,71 (0,41 - 1,22)	0,22	0,72 (0,46 - 1,13)	0,156
MMP14 Estroma Tumoral ^a		0,99 (0,98 - 1,01)	0,999	0,99 (0,98 - 1,000)	0,225

^a Analisado como variável contínua. *Significância estatística $P \leq 0.05$. PR: platino resistente. PS: platino sensível. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de regressão de cox simples.

5.2.2 Avaliação de PGD2 nas amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau

PTGDS é responsável por codificar uma prostaglandina D *sintetase* independente de glutatona em prostaglandina D2 (PGD2). A PGD2 é sintetizada em muitos órgãos e tem sido implicada como uma molécula envolvida em vários processos biológicos e estudada em diversos modelos tumorais, atuando na inibição do crescimento tumoral (KIM et al. 2005; MONIOT et al. 2009; SHYU et al. 2013). Nas amostras normais, a proteína PGD2 apresentou marcação citoplasmática moderada a forte no epitélio de superfície ovariana e fraca a moderada na região cortical do estroma ovariano, figura 7.

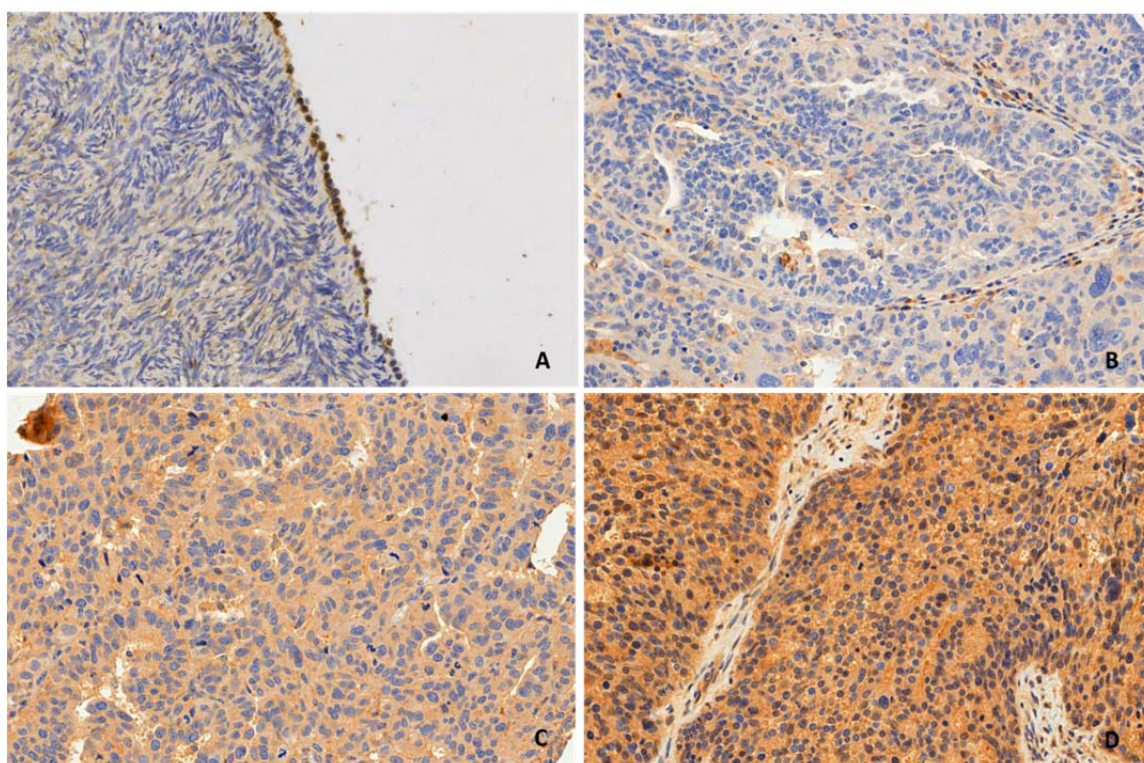


Figura 7 - Expressão proteica por imuno-histoquímica do marcador PGD2. PGD2 se apresenta no citoplasma das células do epitélio da superfície ovariana, B expressão fraca da proteína nos carcinomas serosos de alto grau, C expressão moderada do marcador (d) coloração forte. Todas as imagens com ampliação de 20x.

As amostras tumorais avaliadas apresentaram expressão negativa a fraca da proteína em 22/106 (20,8%) dos casos e marcação moderada a forte em 84/106 (79,2%) dos casos. A positividade para a proteína PGD2 foi elevada em 31/100 (38,8%) no grupo de pacientes sensíveis a quimioterapia e ausente no grupo de pacientes resistentes a quimioterapia 11/100 (55,5%) apresentando uma diferença estatística entre eles ($p = 0,004$). Já a perda proteica foi relacionada com óbito ($p = 0,05$) e pacientes recidivas ($p = 0,026$). Os demais dados clínicos e anatomopatológicos e sua correlação com os níveis de expressão proteica se encontraram na Tabela 12.

Tabela 12 - Distribuição de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de acordo com a expressão negativa a fraca e expressão moderada a forte da proteína PGD2 e dados clínicos e anatomopatológicos

Variáveis	Categoria	n (%)		Valor de p
		Fraco/Negativo	Forte/Moderado	
Invasão vascular linfática	Não	6 (46,2)	18 (31,6)	0,246
	Sim	7 (53,8)	39 (68,4)	
Invasão vascular sanguínea	Não	13 (100)	46 (80,7)	0,085
	Sim	0	11 (19,1)	
Acometimento bilateral	Não	0	16 (29,1)	0,026*
	Sim	12 (100)	39 (70,9)	
Necrose	Presente	7 (46,7)	16 (23,9)	0,076
	Ausente	8 (53,3)	5 (76,9)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	1 (8,3)	2 (3,6)	0,452
	Sim	11 (91,7)	56 (96,4)	
Metástase linfonodal	Não	6 (50)	23 (44,2)	0,968
	Sim	6 (50)	29 (55,8)	
Cirurgia	Primaria	14 (63,6)	65 (77,4)	0,297
	Intervalo	8 (36,4)	19 (55,6)	
Volume de doença residual	Ótima	11 (61,1)	49 (66,2)	0,895
	Subótima	7 (38,9)	25 (33,8)	
Estadiamento	I/II	1 (4,8)	12 (14,6)	0,204
	III/IV	20 (95,2)	70 (85,4)	
CA125 pré operatorio	<738	5 (33,3)	39 (55,7)	0,197
	>738	10 (66,7)	31 (44,3)	
Idade	<59	12 (54,5)	42 (50)	0,889
	>59	10 (45,5)	42 (50)	
Status desempenho	0	5 (27,8)	35 (53)	0,102
	1,2,3	13 (72,2)	31 (31)	
Quimioterapia	Neoadjuvante	14 (70)	61 (82,4)	0,178
	Adjuvante	6 (30)	13 (17,6)	
Óbito	Não	5 (22,7)	41 (48,8)	0,05*
	Sim	17 (77,3)	43 (51,2)	
Recidiva	Não	1 (4,5)	21 (25)	0,026*
	Sim	21 (95,5)	63 (75)	
Resposta clinica a quimioterapia	Platina Resistente	11 (55)	16 (20)	0,04*
	Platina Parcialmente Sensível	2 (10)	17 (21,3)	
	Platina Sensível	4 (20)	16 (20)	
	Não recidivada	3 (15)	31 (38,8)	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de Qui-quadrado.

As curvas de sobrevida global (Figura 8A) mostraram uma significância marginal ($P = 0,071$) onde, pacientes com perda da expressão proteica apresentaram uma mediana de 30 meses na análise de sobrevida global (IC 95% de 1,27 – 58,72). Considerando a sobrevida livre de doença o teste de Log-Rank apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p = 0,009$), onde pacientes com expressão negativa a fraca de PGD2 tiveram menor sobrevida comparado ao grupo de pacientes que tiveram expressão moderada a forte da proteína (mediana de 12 meses - IC 95% 7,51 a 16,48 e mediana de 22 meses - IC 95% de 15,98 a 28,01; respectivamente), figura 8B.

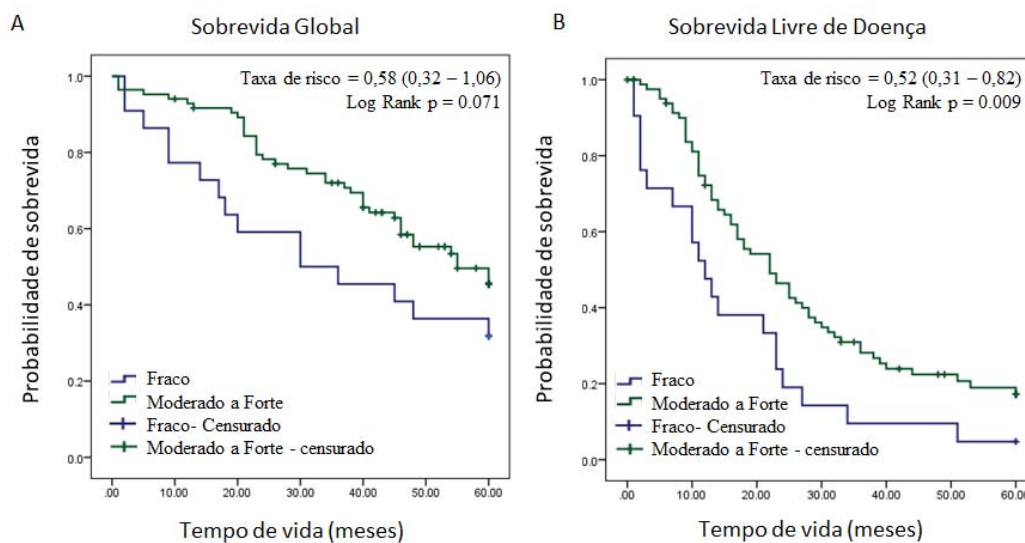


Figura 8 - Curva de sobrevida da proteína PGD2 avaliada no citoplasma das células tumorais pelo teste de *Kaplan-Meier*. (a) Curva de sobrevida global e (b) curvas de sobrevida livre de doença. Todos os valores p calculados pelo teste Log-rank.

O modelo simples de regressão de risco proporcional de Cox mostrou que a expressão negativa a fraca de PGD2 no tumor foi um forte preditor de baixa

sobrevida livre de doença (risco relativo= 0,52; 95% de Intervalo de confiança = 0,31 a 0,86; $p = 0,01$), Tabela 8.

As análises multivariadas que levaram em conta variáveis prognósticas associadas com $p < 0,20$ na análise univariada (Tabela 10) foram inseridas na análise multivariada para identificar fatores prognósticos independentes. As análises multivariadas mostraram associação significativa entre a expressão negativa a fraca de PGD2 e alto risco de progressão da doença (Risco relativo = 0,37; 95% de Intervalo de confiança = 0,20 – 0,69; $p = 0,002$), Tabela 13.

Tabela 13 - Estimativa de parâmetros do modelo de regressão Cox múltiplo para morte e recorrência na coorte avaliada em TMA.

Variáveis	Morte ^a		Recorrência ^b	
	Valor de p	Taxa de risco relativo (95% IC)	Valor de p	Taxa de risco relativo (95% IC)
Cirurgia	0,003	3.608 (1,53 -8.48)	0,002	2,50 (1,39 -4.48)
Volume de doença residual	0,004	3,12 (1,63 - 5,99)	<0.001	2,55 (1,5 - 4,34)
Status desempenho	0.003	3.01 (0.17 - 1.146)	—	—
PGD2	—	—	0,002	0,37 (0,20 - 0,69)

Variáveis independentes utilizadas: Idade, cirurgia, volume de doença residual, estadiamento, status desempenho, tratamento. IC: Intervalo de confiança. Resultado significativo $p \leq 0.05$. ^a Trinta e nove eventos em 74 amostras avaliadas. ^b Sessenta e três eventos em um total de 73 amostras avaliadas. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de regressão de cox múltiplo.

5.2.3 Avaliação de MMP14 citoplasmático nas amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau

Outro gene que teve os resultados de expressão gênica obtidos pelo ensaio de *microarray* validados pela técnica de qRT-PCR foi o *MMP14*. A proteína codificada por esse gene pertence à família de proteinases de remodelação da matriz extracelular do tipo membranas (também conhecida como MT1-MMP) e tem como

substrato colágeno I, II, III, fibronectina, laminina, vitronecrina e ativa proMMP-2 e proMMP3 (SMITH et al. 2002).

Sua expressão proteica se mostrou negativa tanto no epitélio de superfície ovariana quanto nas demais estruturas ovarianas. Figura 9

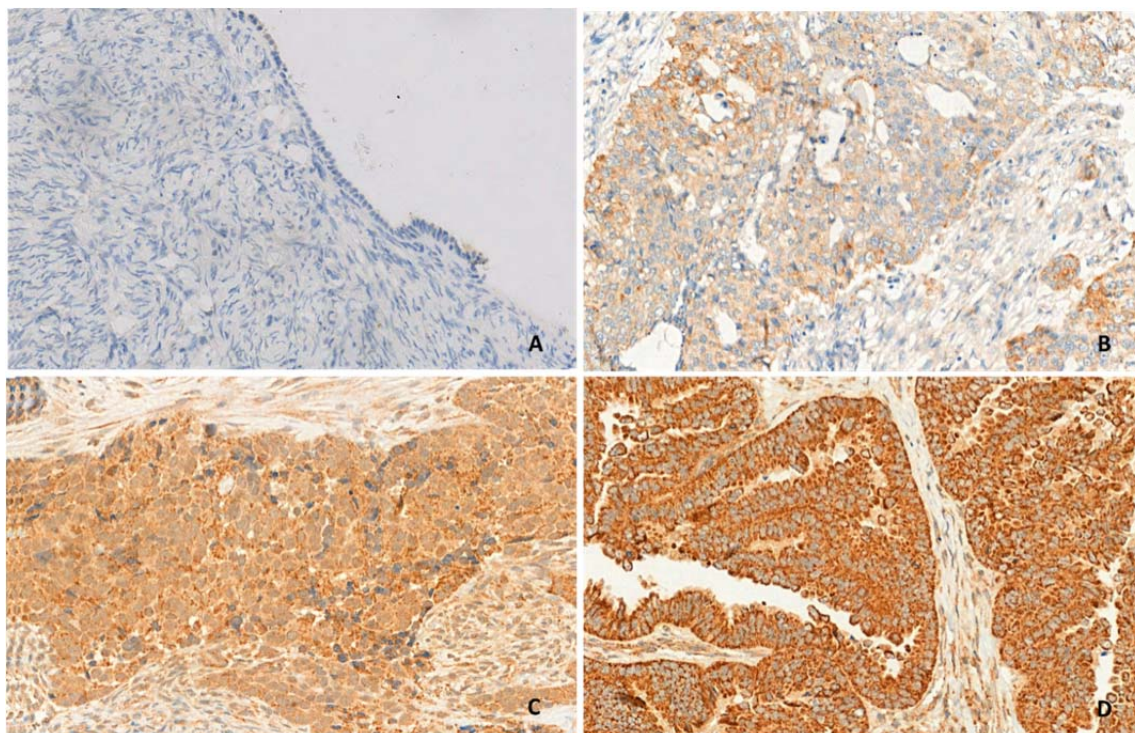


Figura 9 - Expressão proteica por imuno-histoquímica de MMP14 com marcação proteica no citoplasma e estroma tumoral. Em **A** mostrando a ausência de marcação nas células do epitélio da superfície ovariana, **B** marcação fraca nas células de carcinomas seroso de alto grau, caracterizando a mediana <163 ; **C** e **D** marcação caracterizando a mediana >163 . Todas as imagens com ampliação de 20x.

No tecido tumoral, MMP14 apresentou marcação citoplasmática forte e homogênea e foi avaliado em 106 amostras, com uma pontuação média de 159,94 (desvio padrão $\pm 19,85$) e mediana de 163,43 (mínimo 110 e máximo 200). De acordo com os parâmetros morfológicos avaliados a ausência de necrose obteve uma maior média e mediana de expressão da proteína MMP14 ($p = 0,004$). De acordo com a

mediana de idade das pacientes, aquelas abaixo de 59 anos tiveram maior expressão do marcador ($p = 0,055$). Os demais dados clínicos e anatomopatológicos encontram-se resumidos na Tabela 14.

Tabela 14 - Distribuição de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de acordo com expressão de MMP14 avaliados no citoplasma das células tumorais, dados clínicos e anatomopatológicos.

Variáveis	Categoria	n(%)	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	23 (33,3)	161,09(21,89)	165,72 (166,41 - 194,77)	0,593
	Sim	46 (66,7)	165,21 (17,85)	165,98 (113,36 - 200,76)	
Invasão vascular sanguínea	Não	58 (84,1)	162,31 (19,48)	166,05 (113,36 - 200,76)	0,929
	Sim	11 (15,9)	171,84 (16,30)	165,59 (153,80 - 199,75)	
Acometimento bilateral	Não	16 (24,2)	165,04 (19,14)	167,53 (116,41 - 188,347)	0,611
	Sim	50 (75,8)	163,92 (18,81)	164,59 (113,36 - 200,76)	
Necrose	Presente	25 (30,10)	150,24 (22,03)	152,07 (110,51 - 199,75)	0,004*
	Ausente	58 (69,9)	164,33 (18,72)	165,10 (113,36 - 200,76)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	4 (6,1)	157,39 (11,09)	158,60 (143,07 - 169,28)	0,34
	Sim	62 (93,9)	163,51 (19,25)	166,05 (11,36 - 199,75)	
Metástase linfonodal	Não	28 (45,2)	160,66 (19,51)	162,60 (116,41 - 195,86)	0,947
	Sim	34 (54,8)	166,20 (17,92)	168,01 (119,35 - 200,76)	
Cirurgia	Primaria	77 (73,3)	160,50 (20,62)	163,42 (110,51 - 200,76)	0,622
	Intervalo	28 (26,7)	158,37 (17,82)	164,36 (112,14 - 184,26)	
Volume de doença residual	Ótima	60 (66,7)	160,58 (20,46)	163,93 (112,14 - 200,76)	532
	Subotima	30 (33,3)	159,25 (18,10)	163,76 (118,30 - 199,75)	
Estadiamneto	I/II	13 (12,9)	163,56 (18,59)	161,77 (131,66 - 195,86)	0,708
	III/IV	88 (87,1)	159,95 (20,05)	164,36 (110,51 - 200,76)	
CA125 pré-operatorio	<738	41(49,4)	160,04 (19,39)	163,04 (116,41 - 188,37)	0,987
	>738	42 (50,6)	161,72 (17,22)	164,56 (112,14 - 199,75)	

Cont/ Tabela 14

Variáveis	Categoria	n(%)	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p
Idade	<59	52 (49,5)	164,50 (16,76)	164,99 (119,75- 199,75)	0,055
	>59	50 (50,5)	155,46 (21,72)	160,48 (110,51 - 200,76)	
Status desempenho	0	36 (43,4)	166,34 (18,34)	170,41 (118,30 - 200,76)	0,03
	1,2,3	47 (56,6)	156,84 (19,28)	160,48 (112,14 - 184,26)	
Quimioterapia	Neoadjuvante	72 (78,3)	161,41 (19,03)	164,04 (110,51 - 200,76)	0,272
	Adjuvante	20 (21,7)	154,98 (20,84)	164,36 (112,14 - 184,26)	
Óbito	Não	46 (43,8)	164,36 (20,29)	166,60 (112,14 - 200,76)	0,032*
	Sim	59 (56,2)	156,48 (18,95)	155,44 (110,51 - 188,37)	
Recidiva	Não	22 (21,2)	164,51 (20,38)	164,50 (123,10 - 200,76)	0,373
	Sim	82 (78,8)	158,75 (19,78)	163,51 (100,51 - 199,75)	
Resposta clínica a quimioterapia	Platina Resistente	26 (26,5)	156,95 (19,53)	160,08 (110,51 - 184,26)	0,71
	Platina Parcialmente Sensível	20 (20,4)	161,93 (18,83)	165,64 (122,54 -188,37)	
	Platina Sensível	18 (18,4)	158,88 (21,85)	163,09 (116,41 - 184,64)	
	Não recidivada	34 (34,7)	163,81 (20,43)	165,55 (112,14 - 200,76)	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de Mann-Whitney

A fim de calcular a sobrevida global e livre de doença, o grupo de amostras avaliadas foi subdividido e categorizado em amostras com marcação <163 e amostras com >163 , utilizando a mediana como ponto de corte para a dicotomização dos valores. Na análise de sobrevida global, pacientes com expressão <163 de MMP14 apresentaram mediana de 45 meses (95% de Intervalo de confiança = de 31,45 a 58,54) com o teste de Log-Rank apresentando um valor estatístico de $p = 0,099$. A sobrevida livre de doença apresentou uma mediana de 22 meses para pacientes do grupo com a mediana acima de 163 (95% de Intervalo de confiança = 12,57 a 31,42) enquanto pacientes com valores da proteína abaixo de 163 apresentaram 14 meses livre da doença (95% de Intervalo de confiança = 7,83 a 20,17) $p = 0,189$ (Figura 10).

As análises multivariadas para o marcador MMP14 analisado no citoplasma da célula não apresentou associação significativa entre os valores proteicos e as variáveis prognósticas pré-estabelecidas.

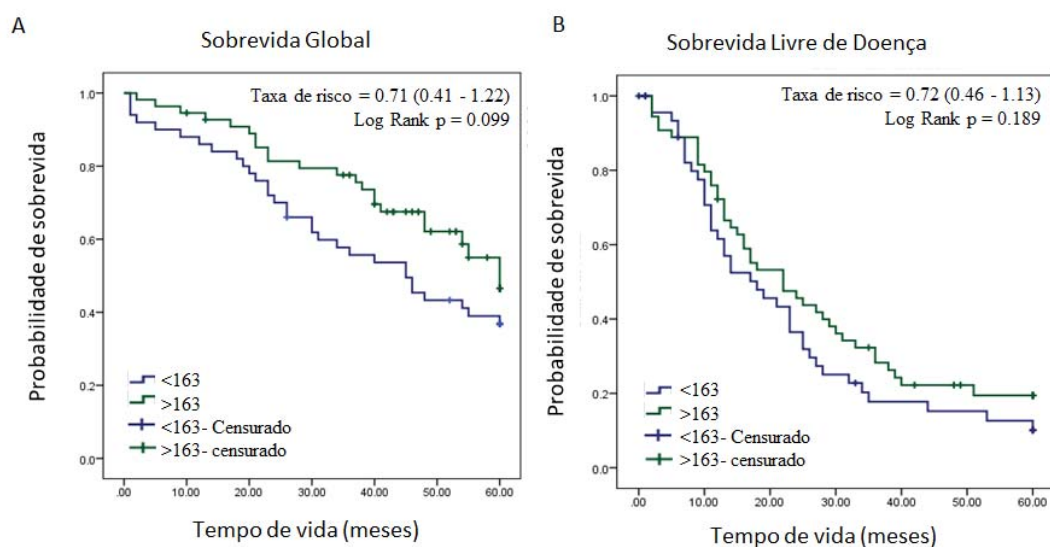


Figura 10 - Curva de sobrevivida da proteína MMP14 avaliada no citoplasma das células tumorais pelo teste de *Kaplan-Meier*. Em **A** mostrando a curva de sobrevivida global e **B** curvas de sobrevivida livre de doença. Todos os valores p calculados pelo teste Log-rank.

5.2.4 Avaliação de MMP14 no estroma tumoral das amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau

Também foi avaliada a marcação no estroma tumoral da proteína MMP14 apresentando 102 casos avaliados com média de 78,37 (desvio padrão $\pm 19,04$) e mediana de 76 (mínimo 31 e máximo 125). Com relação aos dados anatomopatológicos, a ausência de necrose também mostrou uma maior expressão no estroma tumoral de MMP14 ($p = 0,014$) juntamente com estadiamento da doença, onde estadiamento precoce (I-II) mostrou uma maior média e mediana dos valores de MMP14 avaliados no estroma tecidual ($p = 0,023$). Os demais valores clínicos e anatomopatológicos se encontram resumido na Tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau de acordo com expressão de MMP14 avaliados no estroma das células tumorais, dados clínicos e anatomopatológicos.

Variáveis	Categoria	n(%)	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	17 (34,7)	83,11 (14,96)	80 (62 - 114)	0,729
	Sim	32 (65,3)	82,59 (18,16)	77,5 (52 - 125)	
Invasão vascular sanguínea	Não	40 (81,6)	82,57 (17,28)	79,50 (52 - 125)	0,213
	Sim	9 (8,4)	83,66 (16,39)	76 (66 - 112)	
Acometimento bilateral	Não	12 (25)	88,41 (20,28)	83 (62 - 125)	0,353
	Sim	36 (75)	81,75 (15,04)	77,50 (53 - 114)	
Necrose	Presente	9 (17,3)	66,66 (12,96)	71 (42 - 81)	0,014*
	Ausente	43 (82,7)	84,9 (17,49)	81 (53 - 125)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	3 (6,5)	78 (16,64)	71 (66 - 97)	0,469
	Sim	43 (93,5)	83,83 (17,01)	80 (52 - 125)	
Metástase linfonodal	Não	27 (52,9)	21,29 (19,81)	76 (31 - 125)	0,229
	Sim	24 (47,1)	81,7 (16,31)	80,5 (53 - 125)	
Cirurgia	Primaria	57 (89,1)	81,43 (19,87)	76 (31 - 125)	0,289
	Intervalo	7 (10,9)	73 (1,44)	72 (53 - 86)	
Volume de doença residual	Ótima	45 (86,5)	82,88 (17,96)	79 (52 - 125)	0,115
	Subótima	7 (13,5)	67,57 (22,50)	67 (31 - 94)	
Estadiamneto	I/II	12 (19,4)	93 (18,78)	91,5 (70 - 125)	0,023*
	III/IV	50 (80,6)	78,10 (18,35)	75,5 (31 - 119)	
CA125	<738	39 (48,1)	77,92 (19,66)	76 (31 - 125)	0,784
	>738	42 (5,9)	80,47 (19,39)	77,5 (43 - 114)	
Idade	<59	35 (54,7)	82,65 (19,96)	76 (31 - 125)	0,246
	>59	29 (45,3)	77,93 (18,37)	75 (42 - 114)	

Cont/ Tabela 15

Variáveis	Categoria	n (%)	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p
Status desempenho	0	35 (43,8)	82 (18,95)	81 (31 - 125)	0,155
	1,2,3	45 (56,3)	76,35 (18,46)	74 (37 - 114)	
Quimioterapia	Neoadjuvante	53 (98,1)	79,69 (18,84)	76 (31 - 125)	0,333
	Adjuvante	1 (1,9)	64	(64 - 64)	
Óbito	Não	33 (51,6)	82,45 (19,01)	80 (31- 119)	0,298
	Sim	31 (48,4)	78,45 (19,60)	74 (42 - 125)	
Recidiva	Não	15 (23,8)	92,33 (20,68)	98 (57 - 119)	0,013*
	Sim	48 (76,2)	76,83 (17,63)	75,5 (31 - 125)	
Resposta clinica a quimioterapia	Platina Resistente	12 (20)	71,75 (18,01)	70 (42 - 108)	0,208
	Platina Parcialmente Sensível	12 (20)	85,33 (18,42)	81 (61 - 125)	
	Platina Sensível	14 (23,3)	80,71 (13,56)	77,5 (62 - 110)	
	Não recidivada	22 (36,47)	83,59 (21,33)	79,5 (31 - 119)	

*Significância estatística, $P \leq 0,05$. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de Mann-Whitney

Para a avaliação da sobrevida global das amostras com marcação estromal de MMP14 foi feita uma divisão das amostras em dois grupos seguindo o valor da mediana. As amostras que apresentaram marcação >76 apresentaram uma média de 43 meses (IC 95% de 37.69 - 49.96) e 44 meses (IC 95% de 39.39 - 49.25) para amostras com marcação <76 ($p = 0,712$). Na avaliação das curvas de sobrevida livre de doença pacientes com alta expressão estromal da proteína apresentaram uma média 25 meses livre da doença (IC 95% de 19.51 - 30.95) enquanto as pacientes com expressão moderada a fraca apresentaram 26 meses (IC 95% de 21.22 - 31.69) ($p = 0,788$), Figura 11.

As análises multivariadas para o marcador MMP14 analisado no estroma tumoral não apresentou associação significativa entre os valores proteicos e as variáveis prognósticas pré-estabelecidas.

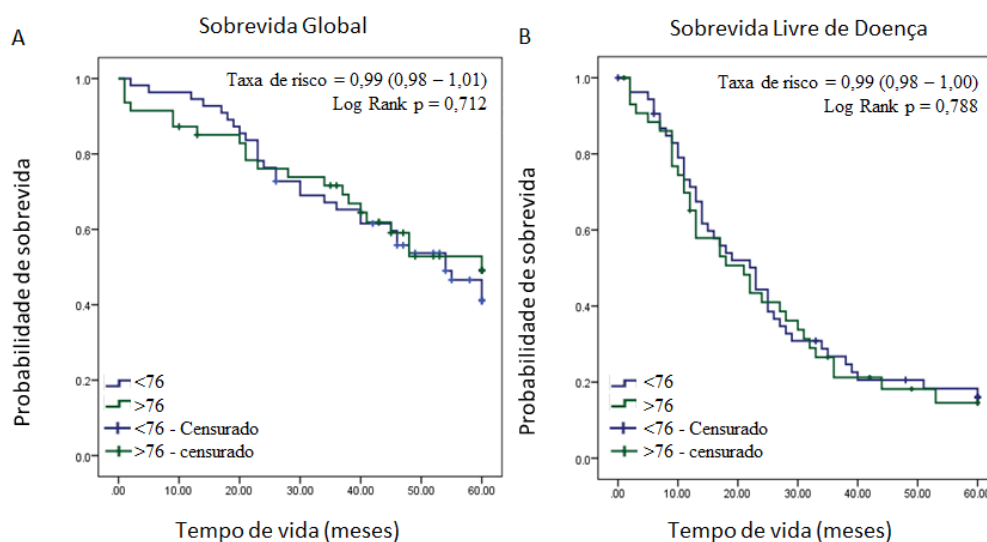


Figura 11 - Curva de sobrevida de MMP14 avaliada no estroma das células tumorais pelo teste de *Kaplan-Meier*. Mostrando em **A** curva de sobrevida global e **B** curvas de sobrevida livre. Todos os valores p calculados pelo teste Log-rank.

Para resumir os resultados da IHQ, o estudo foi conduzido em duas subpopulações, onde 11 amostras foram selecionadas de material a fresco para compor a casuística de estudo para a expressão gênica em larga escala e avaliação proteica foi conduzida em uma casuística maior, contendo 114 casos, todos classificados histologicamente em adenocarcinomas serosos de alto grau. Foi feita uma representação gráfica dos achados das 11 amostras (Figura 12 A e C) e das 114 amostras (Figura 12 B e D).

Na avaliação do gene *PTGDS* (Figura 6), observou-se maior expressão nas pacientes não respondedoras em comparação as respondedoras, aqui chamadas de recidivadas e não recidivadas, respectivamente. Já na avaliação proteica, PGD2 mostrou perfil de expressão invertido quando avaliado nas onze amostras iniciais, comparando com a avaliação do segundo subgrupo de análises, com 114 amostras, Figura 12 A e B. Já para MMP14 o perfil de expressão gênica também mostrou aumento nas pacientes não respondedoras comparadas as pacientes respondedoras (figura 6). Na avaliação da proteína, o perfil das 11 amostras submetidas ao ensaio de expressão gênica apresentou uma leve inversão e nas 114 o perfil se manteve igual nos dois grupos (Figura 12 C e D)

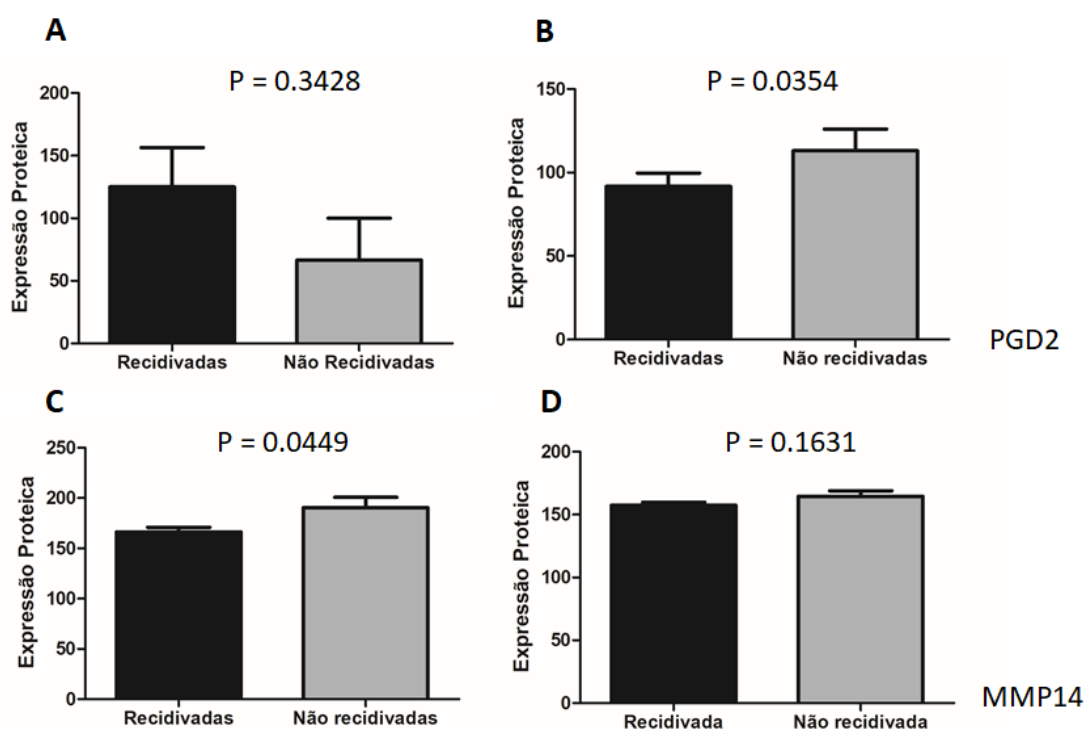


Figura 12 - Representação gráfica das amostras utilizadas no ensaio de IHQ e sua distribuição de acordo com os grupos de análise. (A) Avaliação proteica de PGD2 das 11 amostras utilizadas no ensaio de expressão gênica em larga escala. (B) Avaliação proteica de PGD2 das demais amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau. (C) Avaliação proteica de MMP14 das 11 amostras utilizadas no ensaio de expressão gênica em larga escala. (D) Avaliação proteica de MMP14 das demais amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau. Teste utilizado: Test T com significância estatística, $P \leq 0,05$.

6 AVALIAÇÃO PROTÉICA NAS DEMAIS HISTOLOGIAS

Nosso trabalho visou analisar alterações moleculares e proteicas do carcinoma de ovário do subtipo seroso alto grau, porém durante a revisão dos laudos anatomopatológicos houve reclassificações histológicas e um novo subgrupo (n=61) foi avaliado a fim de descrever a expressão das proteínas alvo em diferentes histologias.

Esse subgrupo é composto por dois (3,3%) tumores serosos *borderlines*, 10 (16,4%) de carcinomas serosos de baixo grau, 19 (31,1%) de carcinomas de célula claras, 13 (21,3%) de carcinomas endometrioides, 11 (18%) de carcinomas mucinosos, dois (3,3%) de carcinomas mistos e 4 (6,6%) de carcinossarcomas. A mediana de idade das pacientes analisadas nesse grupo foi de 54 anos (com mínimo de 17 a e máximo de 83 anos). De acordo com os parâmetros anatomopatológicos, 68,1% e 57,1 das pacientes não tiveram acometimento da superfície ovariana e bilateral da doença, respectivamente. Invasão linfática e sanguínea foram visto em 23,9% e 6,5% das pacientes, respectivamente. Os demais dados sem encontram resumidos na Tabela 16.

Tabela 16 - Frequência dos dados clínico-patológicos das 61 amostras das demais histologias analisadas.

Variáveis clínico-patológicas	Categoria	N/Total (%)
Invasão vascular linfática	Não	35/46 (76,1)
	Sim	11/46 (23,9)
Invasão vascular sanguínea	Não	43/46 (93,5)
	Sim	3/46 (6,5)
Acometimento bilateral	Não	32/47 (68,1)
	Sim	15/47 (31,9)
Necrose	Presente	42/54 (77,8)
	Ausente	12/54 (22,2)
Comprometimento da superfície ovariana	Não	20/35 (57,1)
	Sim	15/35 (42,9)
Metástase linfonodal	Não	30/42 (71,4)
	Sim	12/42 (28,6)
Cirurgia	Primária	50/59 (84,7)
	Intervalo	9/59 (15,3)
Volume de doença residual	<1	41/54 (75,9)
	>1	13/54 (24,1)
Estadiamento	I/II	26/61 (42,6)
	III/IV	35/61 (57,4)
Status desempenho	0	29/50 (58)
	1,2,3	21/50 (42)
CA125 pré-operatório	<112	25/49 (51)
	>112	24/49 (49)
Quimioterapia	Adjuvante	40/51 (78,4)
	Neoadjuvante	11/51 (21,6)
Óbito	Não	38/61 (62,3)
	Sim	23/61 (37,3)
Recidiva	Não	27/60 (45)
	Sim	33/60 (55)
Resposta clínica a quimioterapia	Platina Resistente	11/49 (22,4)
	Platina Parcialmente Sensível	5/49 (10,2)
	Platina Sensível	1/49 (2)
	Não recidivada	29/49 (59,2)

Pelo modelo de regressão de Cox calculamos as taxas de risco relativo das amostras e variáveis clínico patológicas com relação ao tempo de sobrevida global e livre de doença. Os valores de taxa de risco relativo das variáveis clínico patológicos e intervalos de confiança estão resumidos na Tabela 17.

Tabela 17 - Taxa de risco relativo e seus respectivos intervalos de confiança para sobrevida global e sobrevida livre de doença das 61 amostras das demais histologias

Variáveis		Taxa de risco relativo de morte (95% IC)	Valor de p	Taxa de risco relativo de recorrência (95% IC)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	1	0,205	1	0,86
	Sim	1,952 (0,69 - 5,48)		2,16 (0,89 - 5,23)	
Invasão vascular sanguínea	Não	1	0,94	1	0,429
	Sim	0,92 (0,12 - 7,01)		1,66 (0,47 - 5,87)	
Acometimento bilateral	Não	1	0,002	1	0,001
	Sim	5,540 (1,88 - 16,26)		4,51 (1,86 - 10,90)	
Necrose	Não	1	0,387	1	0,547
	Sim	0,576 (0,16 - 2,01)		1,29 (0,56 - 2,96)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	1	0,779	1	0,643
	Sim	1,17 (0,37 - 3,67)		1,28 (0,44 - 3,69)	
Metástase linfonodal	Não	1	0,2	1	0,012
	Sim	2,12 (0,671 - 6,74)		3,2 (1,29 - 8,26)	
Cirurgia	Primária	1	0,01	1	<0,001
	Intervalo	3,25 (1,34 - 9,16)		4,84 (2,20 - 10,66)	
Volume de doença residual	Otima	1	0,006	1	0,001
	Subótima	1,92 (1,20 - 3,13)		1,90 (1,29 - 2,81)	
Estadiamento	I-II	1	0,04	1	0,007
	III-IV	2,81 (1,02 - 7,68)		3,03 (1,36 - 6,77)	
CA125 pré-operatório ^a		1 (1 - 1)	0,931	1 (1 - 1)	0,222
Idade ^a		1,01 (0,98 - 1,04)	0,48	1,01 (0,98 - 1,03)	0,374
Status desempenho	0	1	0,004	1	0,007
	1,2,3	5,38 (1,71 - 16,97)		3,16 (1,36 - 7,34)	
Quimioterapia	Adjuvante	1	0,093	1	<0,001
	Neoadjuvante	2,30 (0,87 - 6,11)		3,9 (1,83 - 8,29)	
Resposta clínica a quimioterapia	PR	1	<0,001	1	<0,001
	PS	0,01 (0,001 - 0,85)		0,01 (0,001 - 0,90)	
PGD2	Presença	1	0,673	1	0,457
	Ausência	0,72 (0,16 - 3,17)		0,63 (0,18 - 2,13)	
MMP14 epitelial ^a		1,00 (0,97 - 1,02)	0,964	1,00 (0,98 - 1,02)	0,642
MMP14 Estroma Tumoral ^a		1,00 (0,97 - 1,03)	0,755	1,83 (0,87 - 1,83)	0,106

^a Analisado como variável contínua *Significância estatística, $P \leq 0.05$. PR: platino resistente. PS: platino sensível

6.1 AVALIAÇÃO DE PGD2 NAS AMOSTRAS NÃO-SEROSO ALTO GRAU

PGD2 foi avaliado no citoplasma das células tumorais nos demais subtipos histológicos (Figura 10) pelo método semiquantitativo do HScore. Foi resumido na Tabela 18 a dicotomização dos resultados em expressão negativa a fraca e expressão moderada a forte da proteína PGD2 de acordo com as histologias.

Tabela 18 - PGD2 avaliado nas diferentes histologias

Histologia	N %	Fraco/Negativo	Moderado/Forte
Seroso alto grau	106 (67,5)	22 (20,8)	84 (79,2)
Seroso baixo grau	7 (4,5)	0	7 (100)
Seroso borderline	2 (1,3)	0	2 (100)
Células Claras	17 (10,8)	1 (5,9)	16 (94,1)
Endometriode	12 (7,6)	2 (16,7)	10 (83,3)
Mucinoso	8 (5,1)	0	8 (100)
Misto	2 (1,3)	1 (50)	1 (50)
Carcinossarcoma	3 (1,9)	0	3 (100)

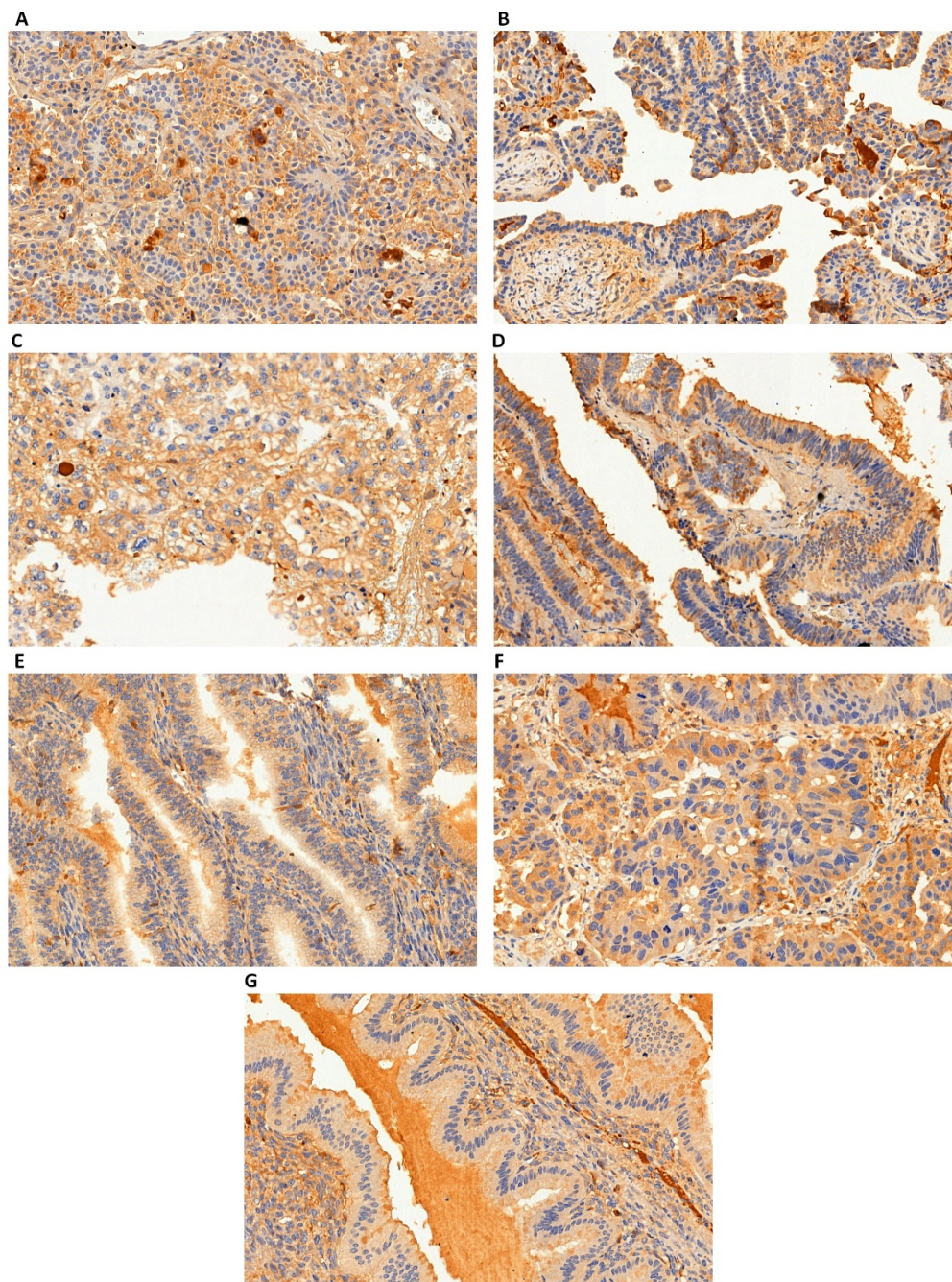


Figura 13 - PGD2 avaliado nos casos classificados como não seroso alto grau. (a) representando um caso de carcinoma seroso de baixo grau marcado por PGD2 (b) seroso *borderline* (c) representando o subtipo célula claras (d) endometrióide (e) mucinoso (f) misto e (g) carcinosarcoma. Todas as imagens com ampliação de 20x.

O teste *T* de *Student* mostra a diferença entre os dois subgrupos histológicos ($p = 0,002$), Figura 14A e a comparação múltipla entre os subgrupos mostra uma maior força estatística entre comparações entre as amostras de serosos de alto grau e amostras de carcinoma de células claras ($p = 0,0046$), Figura 14B.

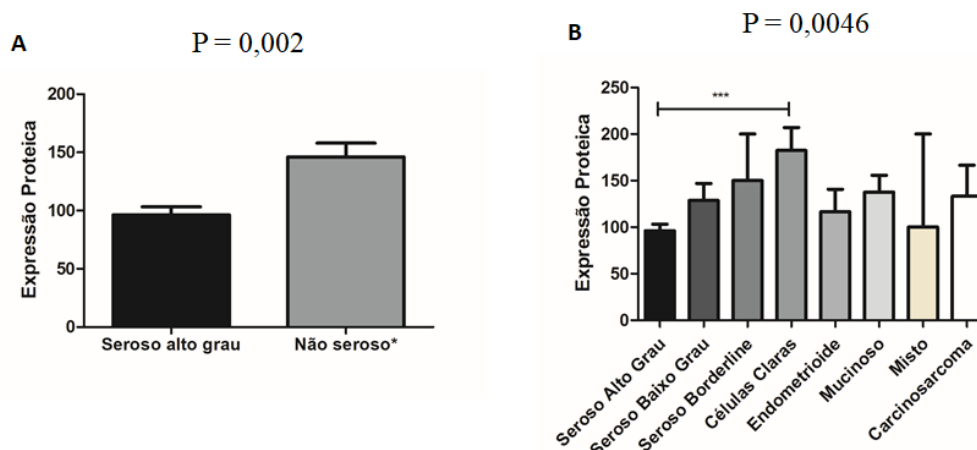


Figura 14 - Comparação das amostras de carcinomas seroso de alto grau e não seroso alto grau na avaliação de PGD2. (a) Teste T comparando as médias do HScore de PGD2 nos dois grupos (seroso alto grau e demais histologias) ($p = 0,002$), (b) Comparações da marcação de PGD2 em cada histologia avaliada ($p = 0,0046$). *outras histologias avaliadas: Células Claras, Endometrioide, Mucinoso, Seroso Baixo Grau, Seroso Borderline, Misto e Carcinosarcoma. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de análise de variância ANOVA.

A Tabela 19 mostra as 61 amostras associadas aos dados anatomopatológicos o padrão de resposta clínica. Com essa casuística não foi possível demonstrar nenhuma diferença estatística entre os dados.

Tabela 19 - Avaliação de PGD2 nos 61 casos envolvendo os demais subtipos histológicos de acordo com dados clínicos e anatomopatológicos

Variáveis	Categoria	n (%)		Valor de p
		Fraco/Negativo	Forte/Moderado	
Invasão vascular linfática	Não	4 (100)	25 (73,5)	0,554
	Sim	0 (0)	9 (25,6)	
Invasão vascular sanguínea	Não	4 (100)	31 (91,2)	1
	Sim	0 (0)	3 (8,8)	
Acometimento bilateral	Não	3 (75)	24 (70,6)	1
	Sim	1 (25)	10 (29,4)	
Necrose	Presente	2 (50)	33 (80,5)	0,209
	Ausente	2 (50)	8 (19,5)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	2 (66,7)	16 (59,3)	1
	Sim	1 (33,3)	11 (40,47)	
Metástase linfonodal	Não	3 (75)	22 (71)	1
	Sim	1 (25)	9 (29)	
Cirurgia	Primaria	4 (100)	37 (82,2)	1
	Intervalo	0 (0)	8 (17,8)	
Volume de doença residual	Ótima	3 (100)	34 (81)	1
	Subótima	0 (0)	8 (19)	
Estadiamento	I/II	3 (75)	19 (40,4)	0,303
	III/IV	1 (25)	28 (59,6)	
CA125 pré operatorio	<112	3 (13,6)	19 (86,4)	0,607
	>112	1 (4,8)	20 (95,2)	
Idade	<56	1 (25)	27 (57,4)	0,316
	>56	3 (75)	20 (42,6)	
Status desempenho	0	2 (50)	24 (61,5)	1
	1,2,3	2 (50)	15 (38,5)	
Quimioterapia	Adjuvante	3 (75)	32 (78)	1
	Neoadjuvante	2 (25)	9 (22)	
Óbito	Não	2 (50)	30 (63,8)	0,623
	Sim	2 (50)	17 (36,2)	
Recidiva	Não	1 (25)	21 (45,7)	0,621
	Sim	3 (75)	25 (54,3)	
Resposta clínica a quimioterapia	Platina Resistente	2 (50)	11 (28,2)	0,787
	Platina Parcialmente Sensível	0 (0)	5 (12,8)	
	Platina Sensível	0 (0)	1 (2,6)	
	Não recidivada	2 (50)	22 (56,4)	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$. Foram obtidos os valores de p utilizando o teste de Qui-Quadrado

As curvas de sobrevida global e livre de doença não mostraram significância quanto à perda da expressão de PGD2, apresentando um valor de Log-rank de $p = 0,708$ e $p = 0,680$, respectivamente. Figura 15.

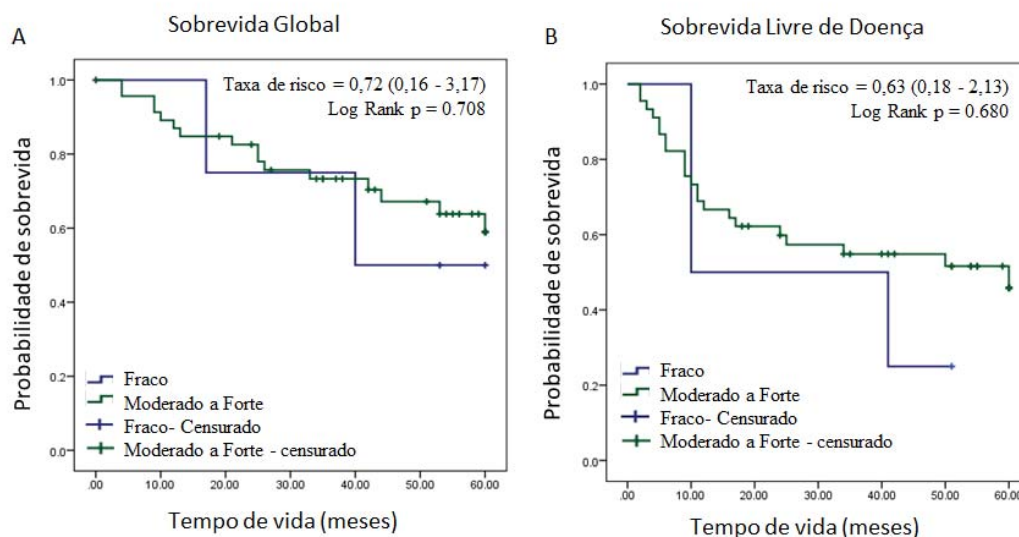


Figura 15 - Curva de sobrevida de PGD2 avaliado nas 61 amostras não seroso alto grau pelo teste de *Kaplan-Meier*. Mostrando em A curva de sobrevida global e B curvas de sobrevida livre de doença. Todos os valores p calculados pelo teste Log-rank

6.2 AVALIAÇÃO DE MMP14 CITOPLASMÁTICO NAS AMOSTRAS NÃO-SEROSO ALTO GRAU

MMP14 foi avaliado no citoplasma e estroma das células tumorais nos demais subtipos histológicos (Figura 16) por análise automatizada. Os valores da quantificação de MMP14 avaliado no citoplasma de acordo com as diferentes histologias encontram-se apresentados na forma de média e mediana na Tabela 20.

Tabela 20 - MMP14 citoplasmático avaliado nas diferentes histologias

Histologia	N %	Média (DP)	Mediana (min-máx)
Seroso alto grau	105 (66)	159,94 (19,85)	163,43 (110,51 - 200,76)
Seroso baixo grau	7 (4,4)	132,80 (15,03)	130,99 (111,12 - 155,01)
Seroso borderline	2 (1,3)	127,67 (5,4)	127,67 (123,81 - 131,53)
Células Claras	19 (11,9)	143,38 (17,27)	141,32 (116,75 - 171,58)
Endometrioide	12 (7,5)	152,39 (20,35)	153,82 (115,07 - 175,57)
Mucinoso	10 (6,3)	136,60 (19,01)	137,67 (110,30 - 161,54)
Misto	2 (1,3)	139,32 (19,71)	139,32 (125,38 - 153,27)
Carcinossarcoma	2 (1,3)	138,40 (23,10)	138,40 (122,07 - 154,74)

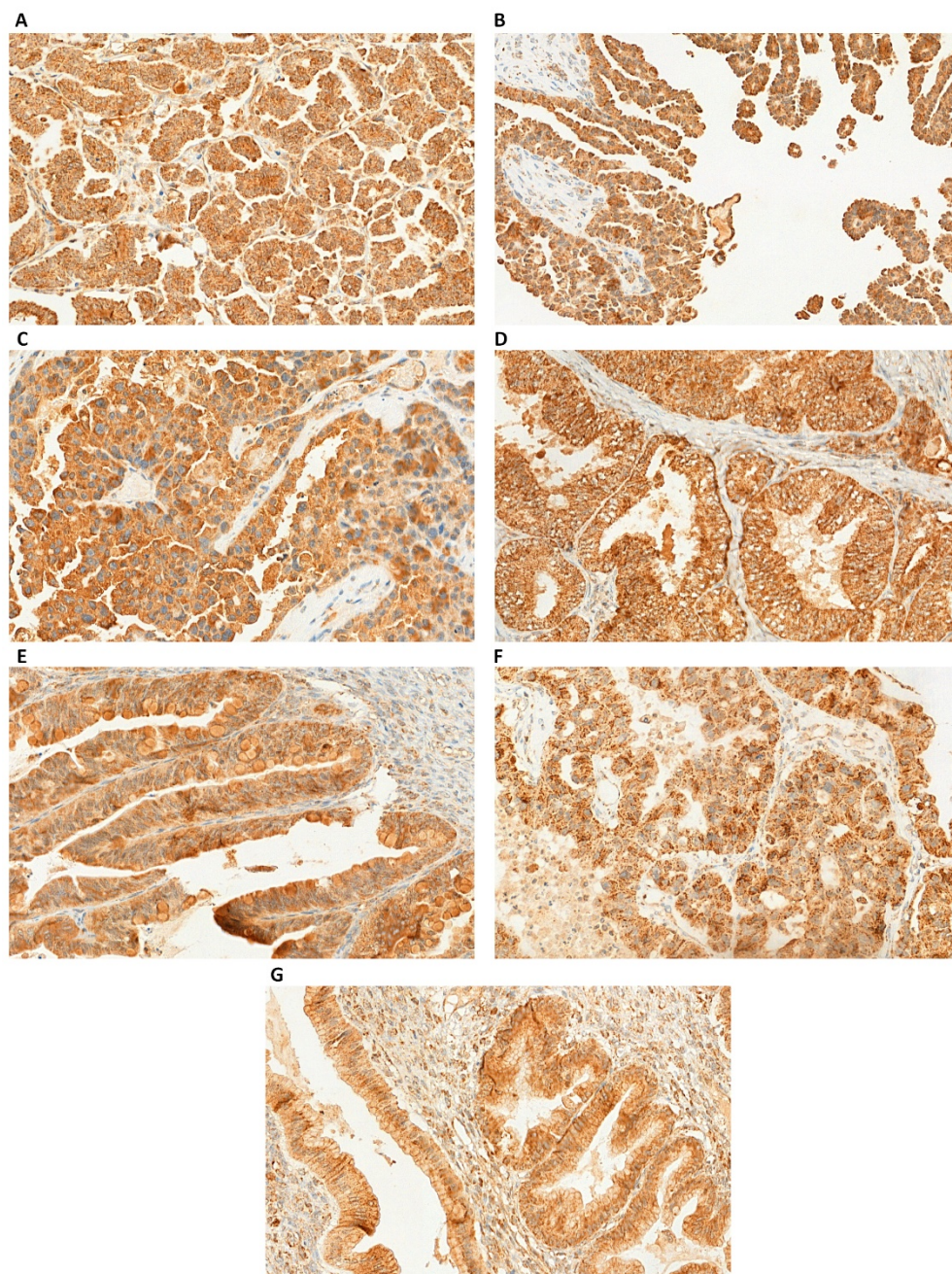


Figura 16 - MMP14 avaliado no citoplasma e estroma tumoral dos casos classificados como não seroso alto grau. (a) representando um caso de carcinoma seroso de baixo grau marcado por MMP14 (b) uma amostra de MMP14 no subtipo seroso *borderline* (c) representando o subtipo célula claras (d) endometriode (e) mucinoso (f) misto e (g) carcinosarcoma. Todas as imagens com ampliação de 20x.

Na avaliação de MMP14 com marcação citoplasmática, o teste *T* de *Student* mostra a diferença entre os dois subgrupos histológicos ($p < 0,001$), Figura 17A. A comparação múltipla entre os subgrupos mostra uma maior força estatística na comparação entre as amostras de serosos de alto grau e amostras de seroso baixo grau, juntamente com seroso alto grau e mucinosos ($p < 0,001$), Figura 17B.

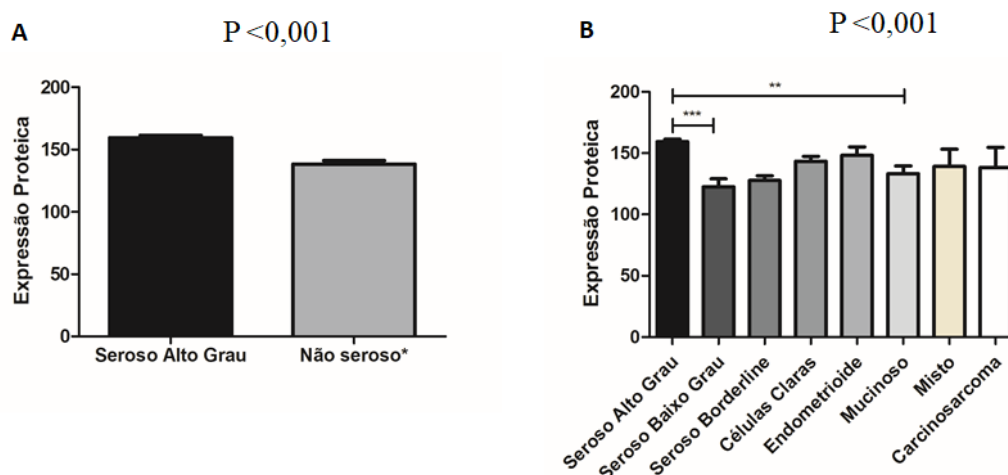


Figura 17 - Comparação das amostras de carcinomas seroso de alto grau e não seroso alto grau na avaliação de MMP14 citoplasmático. (a) teste T comparando as médias da pontuação pelo *software Visiopharm* de MMP14 avaliado no citoplasma das células tumorais nos dois grupos (seroso alto grau e demais histologias) ($p < 0,001$), (b) Comparações da marcação de MMP14 citoplasmático em cada histologia avaliada ($p < 0,001$). *outras histologias avaliadas: Células Claras, Endometriode, Mucinoso, Seroso Baixo Grau, Seroso Borderline, Misto e Carcinossarcoma.

O teste estatístico de Mann-Whitney foi aplicado nas 61 amostras juntamente com os dados clínicos e anatomopatológicos. Não foi possível demonstrar nenhuma diferença estatística entre a marcação de MMP14 citoplasmática e os dados clínicos e anatomopatológicos (Tabela 21).

Tabela 21 - Avaliação de MMP14 citoplasmático nos 61 casos envolvendo os demais subtipos histológicos de acordo dados clínicos e anatomopatológicos

Variáveis	Categoria	N %	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	32 (78)	141,05 (19,48)	139,85 (110,30 - 175,57)	0,699
	Sim	9 (22)	144,26 (18,21)	141 (120,72 - 171,58)	
Invasão vascular sanguínea	Não	38 (92,7)	141,28 (19,13)	139,85 (110,30 - 175,57)	0,618
	Sim	3 (7,3)	147,76 (20,33)	141,91 (130,99 - 170,38)	
Acometimento bilateral	Não	29 (70,7)	141,28 (18,32)	138,75 (111,12 - 175,43)	0,854
	Sim	12 (29,3)	142,91 (21,47)	143,20 (110,30 - 175,57)	
Necrose	Não	39 (79,6)	140,77 (19,29)	140,62 (110,30 - 175,57)	0,855
	Sim	10 (20,4)	142,63 (17,49)	139,78 (115,44 - 170,38)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	19 (57,6)	146,65 (19,60)	146,61 (115,07 - 175,57)	0,163
	Sim	14 (42,4)	136,88 (15,31)	138,41 (115,44 - 170,38)	
Metástase linfonodal	Não	27 (73)	114,11 (21,22)	140,96 (110,30 - 175,57)	0,555
	Sim	10 (27)	138,60 (18,33)	141,61 (111,12 - 170,38)	
Cirurgia	Primaria	44 (84,6)	142,51 (19,03)	140,79 (110,30 - 175,57)	0,775
	Intervalo	8 (15,4)	139,83 (17,96)	139,84 (111,12 - 160,76)	
Volume de doença residual	<1cm	39 (81,3)	143,75 (19,27)	143,29 (110,30 - 175,43)	0,55
	>1cm	9 (18,8)	139,85 (18,01)	137,48 (120,17- 175,57)	
Estadiamento	I-II	25 (46,3)	144,85 (18,62)	143,29 (110,30 - 175,43)	0,278
	III-IV	29 (53,7)	139,26 (18,33)	138,37 (111,12 - 175,57)	
CA125	<112	22 (51,2)	148,42 (18,69)	150,82 (110,30 - 175,50)	0,109
	>112	21 (48,8)	139,79 (17,55)	138,75 (111,12 - 171,58)	
Idade	<56	29 (53,7)	142,95 (19,88)	141,91 (110,30 - 175,57)	0,585
	>56	25 (46,3)	140,55 (17,09)	140,62 (111,12 - 175,42)	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$

Cont/ Tabela 21

Variáveis	Categoria	N %	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p
ECOG	0	26 (60,5)	146,89 (19,95)	146,75 (110,30 - 175,57)	0,214
	1,2,3	17 (39,5)	139,81 (18,18)	138,37 (111,12 - 170,38)	
Quimioterapia	Adjuvante	34 (77,3)	143,79 (19,25)	143,89 (110,30 - 175,57)	0,572
	Neoadjuvante	10 (22,7)	140,02 (15,84)	140,79 (111,12 - 160,76)	
Óbito	Não	35 (64,8)	142,59 (19,36)	140,96 (110,30 - 175,43)	0,644
	Sim	19 (35,2)	140,46 (17,24)	138,37 (120,17 - 175,57)	
Recidiva	Não	24 (45,3)	142,06 (19,71)	141,72 (110,30 - 175,43)	0,971
	Sim	29 (54,7)	142,22 (17,87)	140,96 (111,12 - 175,57)	
	Resistente	11 (26,2)	140,95 (17,50)	141,91 (120,51 - 171,58)	
Resposta	Parcialmente sensíveis	5 (11,9)	154,90 (20,46)	159,01 (127,03 - 175,57)	0,494
	Sensíveis	1 (2,4)	136,74	136,74	
	Não recidivadas	25 (59,5)	142,69 (18,90)	144,94 (110,30 - 175,43)	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$

6.3 AVALIAÇÃO DE MMP14 NO ESTROMA TUMORAL NAS AMOSTRAS NÃO-SEROSO ALTO GRAU

Os valores da quantificação de MMP14 avaliado no estroma das células tumorais de acordo com as diferentes histologias se encontram resumidos na Tabela 22.

Tabela 22 - MMP14 avaliado no estroma tumoral nas diferentes histologias

Histologia	N %	Média (DP)	Mediana (min-máx)
Seroso alto grau	102 (65,4)	78,37 (19,04)	76 (31 - 125)
Seroso baixo grau	7 (4,5)	47,28 (21,08)	39 (23 - 80)
Seroso borderline	2 (1,3)	52 (4,2)	52 (49 - 55)
Células Claras	19 (12,2)	60,89 (14,85)	55 (38 - 95)
Endometriode	12 (7,7)	64 (18,63)	62 (38 - 109)
Mucinoso	10 (6,4)	58,40 (14)	59,50 (41 - 81)
Misto	2 (1,3)	58,50 (10,60)	58,5 (51 - 66)
Carcinossarcoma	2 (1,3)	74,5 (9,19)	74,5 (68 - 81)

MMP14 avaliado no estroma tecidual também apresentou diferença entre os dois subgrupos histológicos ($p < 0,001$), Figura 18A. A comparação múltipla entre os subgrupos seguiu os mesmos resultados da proteína avaliada no citoplasma celular, apresentando uma maior força estatística entre amostras de carcinoma seroso de alto grau avaliado no estroma tumoral e amostras de seroso baixo grau, juntamente com seroso alto grau e mucinosos ($p < 0,001$), Figura 18B.

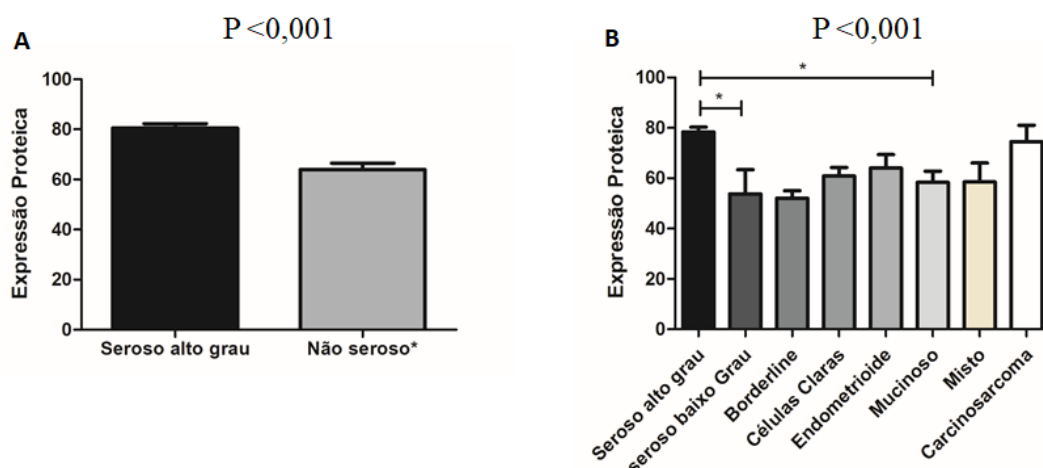


Figura 18 - Comparação das amostras de carcinomas seroso de alto grau e não seroso alto grau na avaliação de MMP14 estromal. (a) teste T comparando as médias do HScore de MMP14 avaliado no estroma das células tumorais nos dois grupos (seroso alto grau e demais histologias) ($p < 0,001$), (b) Comparações da marcação de MMP14 estromal em cada histologia avaliada ($p < 0,001$). *outras histologias avaliadas: Células Claras, Endometrióide, Mucinoso, Seroso Baixo Grau, Seroso Borderline, Misto e Carcinossarcoma.

A avaliação de MMP14 no estroma tumoral nos 61 casos utilizando o teste de Mann-Whitney, comparando valores da expressão proteica e dados clínicos patológicos também não mostrou nenhuma diferença estatística entre a marcação estromal e os dados clínicos e anatomopatológicos (Tabela 23).

Tabela 23 - MMP14 avaliado no estroma tumoral dos 61 casos envolvendo os demais subtipos histológicos de acordo dados clínicos e anatomopatológicos

Variáveis	Categoria	N %	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p
Invasão vascular linfática	Não	32 (78)	59,90 (17,34)	55,5 (23 - 109)	0,841
	Sim	9 (22)	58,88 (19,99)	67 (26 - 80)	
Invasão vascular sanguínea	Não	38 (92,7)	59,73 (17,12)	56 (23 - 1069)	0,795
	Sim	3 (7,3)	59 (28,93)	71 (26 - 80)	
Acometimento bilateral	Não	29 (70,7)	62,13 (18,62)	58 (23 - 109)	0,127
	Sim	12 (29,3)	53,75 (14,20)	50,5 (36 - 80)	
Necrose	Não	39 (79,6)	58,56 (17,82)	58 (23 - 109)	0,566
	Sim	10 (20,4)	62,40 (12,65)	58,5 (47 - 80)	
Comprometimento da superfície ovariana	Não	19 (57,6)	63,84 (18,38)	56 (38 - 109)	0,339
	Sim	14 (42,4)	57,57 (14,24)	57 (36 - 80)	
Metástase linfonodal	Não	27 (73)	58,55 (17,60)	56 (26 - 109)	0,649
	Sim	10 (27)	61,30 (20,54)	61 (23 - 95)	
Cirurgia	Primaria	44 (84,6)	59,81 (15,09)	58 (36 - 109)	1
	Intervalo	8 (15,4)	58,5 (25,86)	61 (23 - 95)	
Volume de doença residual	<1cm	39 (81,3)	61,33 (17,83)	61 (23 - 109)	0,361
	>1cm	9 (18,8)	55,22 (14,05)	58 (36 - 76)	
Estadiamento	I-II	25 (46,3)	61,84 (15,71)	58 (38 - 109)	0,445
	III-IV	29 (53,7)	57,37 (17,25)	56 (23 - 95)	
CA125	<112	22 (51,2)	63,83 (18,84)	58 (26 - 109)	0,808
	>112	51 (48,8)	61 (13,61)	64 (23 - 80)	
Idade	<56	29 (53,7)	60,48 (18,08)	58 (26 - 109)	0,646
	>56	25 (46,3)	58,24 (14,86)	56 (23 - 95)	

Cont/ Tabela 23

Variáveis	Categoria	N %	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p
ECOG	0	26 (60,5)	62,15 (16,79)	61,5 (26 - 109)	0,737
	1	17 (39,5)	60,88 (18,11)	56 (23 - 95)	
Quimioterapia	Neoadjuvante	34 (77,3)	58,47 (12,94)	56,5 (36 - 81)	0,858
	Adjuvante	10 (22,7)	58,4 (22,83)	58 (23 - 95)	
Obito	Não	35 (64,8)	59,97 (17)	58 (23 - 109)	0,605
	Sim	19 (35,2)	58,47 (16,01)	55 (36 - 95)	
Recidiva	Não	24 (45,3)	61,62 (15,55)	59,5 (38 - 109)	0,503
	Sim	29 (54,7)	57,75 (17,68)	56 (23 - 95)	
	Resistente	11 (26,2)	57,45 (14,21)	54 (36 - 80)	
Resposta	Parcialmente sensíveis	5 (11,9)	61,4 (15,48)	60 (38 - 76)	0,905
	Sensíveis	1 (2,4)	61	61	
	Não recidivadas	25 (59,5)	56,88 (15,51)	55 (23 - 81)	

*Significância estatística, $P \leq 0.05$

Com relação às curvas de sobrevida das 61 pacientes avaliadas com relação à expressão de MMP14 citoplasmático e estromal, não foi visto nenhuma diferença estatística de acordo com o teste de Log-rank, Figuras 19 e 20. Ao compararmos com as curvas de sobrevida das amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau podemos notar uma inversão dos padrões das curvas, Figuras 19 e 20.

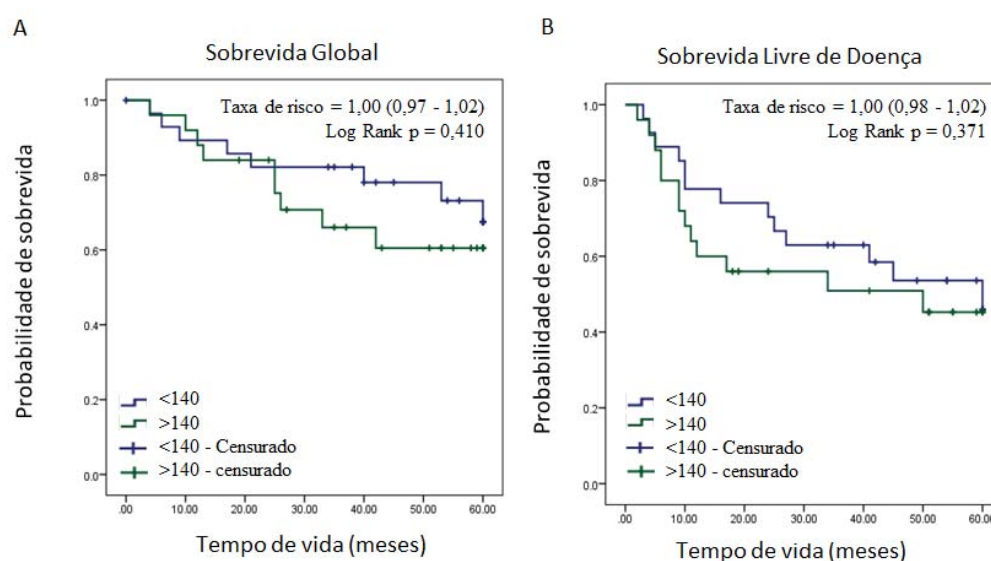


Figura 19 - Curva de sobrevida de MMP14 avaliada no citoplasma nas 61 amostras não seroso alto grau pelo teste de *Kaplan-Meier*. Mostrando em A curva de sobrevida global e B curvas de sobrevida livre de doença. Todos os valores p calculados pelo teste Log-rank

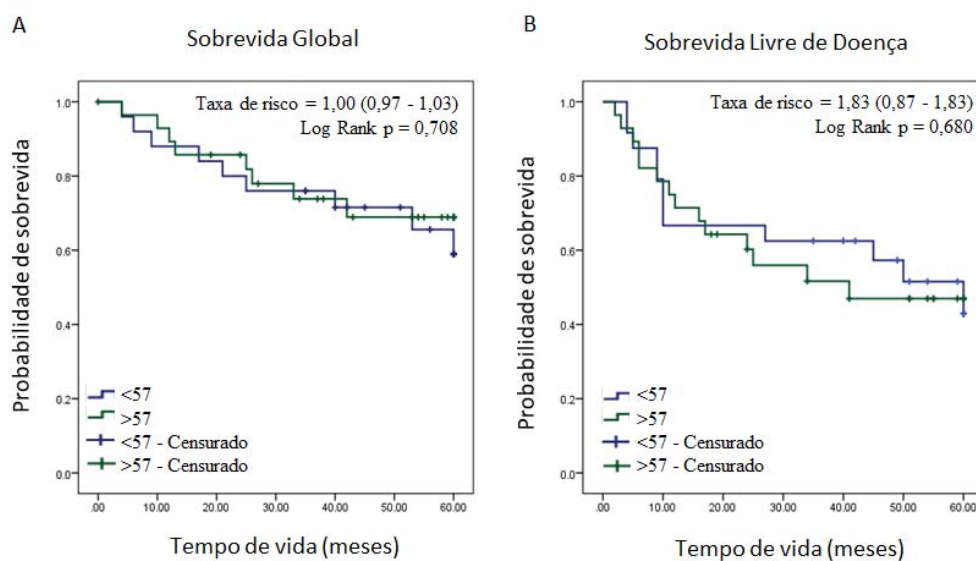


Figura 20 - Curva de sobrevivência de MMP14 avaliada no estroma nas 61 amostras não seroso alto grau pelo teste de *Kaplan-Meier*. Mostrando em (a) curva de sobrevivência global e (b) curvas de sobrevivência livre de doença. Todos os valores p calculados pelo teste Log-rank

7 DISCUSSÃO

O câncer de ovário é a malignidade ginecológica mais letal em todo o mundo, com uma baixa sobrevida das pacientes acometidas. Atualmente, histologia, estadiamento e doença residual após a cirurgia primária são os fatores importantes utilizados para avaliar a probabilidade de sobrevida, mas a necessidade de novos marcadores prognósticos permanece. É vista a necessidade de mais subclassificações da doença visto que, uma parcela das pacientes classificadas quanto aos mesmos fatores prognósticos já bem estabelecidos na doença responderão a quimioterapia, enquanto um grupo de mulheres irá recidivar, podendo criar resistência à doença (COOKE e BRENTON 2011).

Para estimar fatores prognósticos das doenças malignas, os parâmetros clínico-patológicos clássicos são de extrema importância. Estudos moleculares de vários tipos de câncer descreveram subclasses de tumores no que diz respeito ao prognóstico permitindo revelar novas metas possíveis para o tratamento da doença. PEROU et al. (2000) introduziram dados de *microarray* para a subclassificação molecular do câncer de mama há mais de 17 anos e desde então pesquisas vem sendo publicadas, mostrando assinaturas gênicas para a subclassificação molecular de uma variedade de entidades tumorais.

Tendo em vista a necessidade de entendimento da complexidade da doença, o atual trabalho almejou definir um marcador de resposta clínica para o subtipo que é mais frequentemente acometido no carcinoma de ovário. Para isso, criamos um grupo homogêneo de amostras com relação a fatores prognósticos para análise de

expressão gênica em larga escala. Mesmo em meio a tantos trabalhos realizados e disponíveis na literatura que usaram como metodologia a expressão gênica em larga escala e carcinoma de ovário como modelo tumoral, o delineamento da pesquisa em questão seguiu um padrão diferencial ao isolar fatores prognósticos independentes da doença criando assim um grupo homogêneo de análise, na busca de achados fidedignos, seguindo um mesmo padrão biológico.

Com a introdução do *microarray* e o surgimento da bioinformática, as análises da expressão gênica começaram a oferecer informações prognósticas poderosas para vários tipos de câncer. O *microarray* é uma técnica de hibridação que permite a investigação de níveis de expressão de milhares de genes em uma mesma plataforma. Para tal, utiliza sondas complementares a diversos genes e permite, por técnicas de hibridação com o cDNA marcado com fluoróforo, avaliar sua expressão gênica. Nosso estudo utilizou uma plataforma com aproximadamente 40.000 mil probes. Este *microarray* com formato múltiplo representa uma visão compilada do genoma humano como é entendido hoje. A informação de sequências usadas para projetar a plataforma foi derivada de um amplo levantamento de fontes bem conhecidas, como RefSeq, Ensembl dentre outros.

KONECNY et al. (2014) utilizaram a mesma abordagem técnica para determinar perfis de expressão gênica em 174 amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau e sua pesquisa demonstrou um significado prognóstico das assinaturas gênicas encontradas em conjunto com o banco de dados do TCGA, atingindo um dos objetivos do seu trabalho, que propôs inicialmente averiguar os achados do TCGA em uma casuística independente. Esse trabalho abriu novas perspectivas para WINTERHOFF et al. (2016) entenderem o quanto os carcinomas de células claras e

endometrioides podem compartilhar assinaturas gênicas previamente descritas nos carcinomas serosos de alto grau por KONECNY et al. (2014). Essas descobertas oriundas de plataformas de perfil de expressão de médio alcance contribuíram no entendimento quanto a diferentes histologias do câncer epitelial de ovário podendo melhor guiar decisões terapêuticas (WINTERHOFF et al. 2016).

Os dados extraídos do banco do TCGA para comparação com os nossos dados obtidos pelo teste de expressão gênica em larga escala resultou em 219 genes diferencialmente expressos, dentre esses *CD109*, *DDX43*, *FILIP1*, *KCNQ2*, *MRAP2*, *PRSS1*, *SP5*, *ZNF208* e *POF1B*, gene esse candidato para insuficiência ovariana prematura e que na nossa casuística se encontrou hipo-regulado, indo de encontro com a hipótese de que a menopausa evolui para proteger os órgãos reprodutivos do constante ciclo de ruptura e reconstrução tecidual que consequentemente impede a evolução para um fenótipo neoplásico, como por exemplo o câncer de ovário.

Os genes encontrados em comum tanto na plataforma de expressão gênica em larga escala quanto no banco de dados do TCGA seguem como alvos promissores, além do alto potencial biológico (como por exemplo o gene *POF1B*), porém seus valores de *fold change* tiveram como valor máximo 1,64 e mínimo de -2,13; considerado um valor baixo, podendo comprometer o potencial de replicação dos dados pela técnica de qRT-PCR. Quanto aos genes selecionados para validação (*MMP14*, *PLCβ2* e *PTGDS*), todos apareceram compilados na lista de genes do banco de dados do TCGA, porém sem valor estatístico de significância quando comparados aos grupos de pacientes respondedoras e não respondedoras.

A casuística utilizada no ensaio de *microarray* teve uma mediana livre de progressão de 21 meses, dados semelhante ao relatado na literatura, juntamente a

72% de pacientes que tiveram recidiva em menos de 2 anos (ARMSTRONG 2002). Uma análise *in-silico* dos dados obtidos utilizando o *software* IPA mostrou que os moduladores diferencialmente expressos na plataforma de *microarray* estavam fortemente envolvidos no câncer quando avaliados doenças e desordens, seguidos por uma lista de distúrbios envolvidos no mecanismo de câncer (Tabela 6). A análise de enriquecimento de nossa lista de genes demonstrou que eles interagem em redes principais que regulam diversas funções do desenvolvimento e progressão do câncer, corroborando a seleção dos nossos *drivers*. Esses achados mostram que nossa triagem inicial segue um modelo de confirmação do estudo.

Um dos genes hiper-expressos destacados pelo *software* IPA como um importante modulador foi o PAX 8 (tabela 5) que já se apresenta fortemente implantado na rotina de diagnóstico anatomopatológico, expresso em 80-96% dos tumores do subtipo seroso de alto grau (BOWEN et al 2007; RODGERS 2016) e considerado um marcador útil para distinguir os cânceres ginecológicos de malignidades não ginecológicas, incluindo mesoteliomas malignos (LAURY et al 2010), câncer de origem gastrointestinal e mama (NONAKA et al 2008; OZCAN et al 2011), que são sítios comuns de se metastatizar no ovário.

Outra evidencia de confirmação do nosso modelo é o envolvimento da via de sinalização em p53 nos dois *softwares* utilizados para análise *in-silio*. IPA e KOBAS demonstraram com alto poder estatístico o envolvimento da via de sinalização em p53 nas amostras analisadas. O gene supressor de tumor *TP53* encontra-se frequentemente mutado em câncer, incluindo mais de 96% do adenocarcinoma seroso de alto grau (COLE et al. 2016). As mutações patogênicas resultam em perda da atividade da proteína p53, resultando também em ganho de uma função

oncogênica para a proteína mutada, podendo essas contribuir para a tumorigênese e o desenvolvimento de resistência a drogas (OREN e ROTTER 2010).

A proteína p53 além de responsável pela regulação do ciclo celular, também regula o reparo do DNA de forma que a perda da sua função favorece a instabilidade genética. As alterações da via de reparo do DNA da recombinação homóloga também favorecem a presença de instabilidade genética. Alterações desta via estão presentes em até 50% do subtipo seroso alto grau (TCGA 2011) podendo ocorrer por mutações em *BRCA1* e *BRCA2* e demais genes da via, envolvidos em casos de câncer familiar podendo também ter um efeito sobre o risco de câncer esporádico. Nas análises *in silico* pelo *software* IPA detectamos em funções moleculares e celular a via de replicação do DNA, recombinação e reparo como um potencial via alterada nas nossas amostras ($p < 0,001$).

Redes de interações entre dados foram capazes de mostrar alguns dos moduladores selecionados interligados com *AKT* como modulador central. *AKT* é conhecido por desempenhar um papel em muitos processos celulares que, quando desregulados, podem contribuir para o desenvolvimento ou progressão do câncer. As cinases AKT / PKB (proteína quinase B), que incluem AKT1, AKT2 e AKT3, são intermédios chave das vias de sinalização que regulam os processos celulares que controlam a proliferação, sobrevivência, metabolismo da glicose, estabilidade do genoma e angiogênese (BELLACOSA et al. 2005). AKT também demonstrou contribuir com a invasão e metástase de tumores promovendo a secreção de metaloproteinases (KIM et al. 2001). ZHANG e BRODT (2003) mostraram que o receptor para o fator de crescimento de tipo I *insulina like* (IGF-IR) e seus ligantes IGF-I e IGF-II desempenham papéis críticos na regulação da proliferação celular,

apoptose e transformação celular, juntamente com a regulação da síntese de MT1-MMP e invasão através da ativação da via PI3k-Akt / Mtor.

Descrevemos uma abordagem exploratória, para identificar candidatos de genes diferencialmente expressos nos nossos grupos de análise e para isso contamos com uma pequena casuística de casos minimamente selecionados. O tecido a fresco se mostra mais eficiente na obtenção da quantidade proposta de mRNA, razão pela qual nos limitou no número de pacientes analisadas no ensaio. A pequena casuística também influenciou nos resultados da correção dos dados pelo teste de *Bonferroni*, sendo esse o teste padrão utilizado em análises de comparações múltiplas, o que foi considerado em nossas amostras, excessivamente restritivo, acreditando-se justificar pela baixa quantidade de amostras utilizadas na análise de expressão gênica.

O *microarray* é uma poderosa tecnologia molecular que permite o estudo da expressão de mRNA, dando uma prévia da expressão gênica na amostra avaliada. No entanto, a qualidade de dados de expressão obtidos pode variar de acordo com a plataforma e os procedimentos na área técnica. Para maior confiabilidade dos resultados, atuais diretrizes exigem que todos os resultados de *microarray* sejam validados por um método independente de expressão de genes. PCR em tempo real é o método de escolha, considerado o padrão ouro na análise de validação de expressão gênica em larga escala (MOREY et al. 2006; QIN et al. 2006).

O *fold change* final da matriz de *microarray*, que é o valor obtido através da média do grupo de comparação proposto apresentou os genes *PTGDS* e *MMP14* como hiper-expressos hibridizados com uma amostra de RNA referência, este utilizado como denominador de comparação entre as amostras na técnica de *microarray*. A técnica de qRT-PCR correlacionou os dois achados do mesmo

material de RNA e a partir desses resultados, procurou-se avaliar o comportamento proteico desses alvos.

Para a análise do produto proteico utilizamos material arquivado em parafina, que conta com uma maior disponibilidade de armazenamento e possibilidade de trabalho. Por essa razão expandimos os achados de mRNA em uma casuística maior, envolvendo, 114 amostras de carcinomas serosos de alto grau e 61 amostras das demais histologias, compondo um grupo de análises em paralelo, afim de comparar o comportamento dos nossos marcadores em diferentes histologias.

O gene *MMP14* se mostrou através da avaliação pelo *microarray* hiper-expresso nas pacientes não respondedoras com relação às pacientes respondedoras (*fold change* = 7,84). A técnica de validação para esses achados também correlacionou os dois resultados ($r = 0,625$; $p = 0.04$) e a avaliação em uma amostra independente (avaliação proteica) apresentou elevada expressão proteica de acordo com a avaliação automatizada das imagens de IHQ (mediana de 163,43 com valor mínimo de 110 e máximo de 200).

Na avaliação proteica, 69,1% das pacientes que compunham a atual casuística foram diagnosticadas no estadiamento FIGO III, definido por tumor com implantes além da pélvis e/ou linfonodos intra-abdominais comprometidos, podendo se estender ao intestino delgado ou omento (Edge and Compton 2010). 19,1% (correspondendo a 21 de 110 pacientes com informações completas sobre o estadiamento) são pertencentes ao estadiamento FIGO IV (presença de metástases à distância para órgãos extra-abdominais, incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal) (EDGE e COMPTON 2010).

A invasão local e disseminação distante de neoplasias malignas envolvem a

degradação das membranas basais subepiteliais e subendoteliais e a modificação da matriz extracelular (SMITH et al. 2002). Sabe-se que este processo depende de uma série de interações complexas entre células tumorais, células estromais derivadas de hospedeiro e células endoteliais. Estas interações são mediadas por uma série de fatores, incluindo enzimas proteolíticas, moléculas de adesão, fatores de transcrição e componentes da matriz extracelular (KHOKHA et al. 2013).

As metaloproteinases de matriz compreendem uma complexa família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio que se encontram inteiramente interligadas a invasão e metástase. As MMPs são capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, incluindo a membrana basal, que serve como barreira entre os compartimentos teciduais (KHOKHA et al. 2013). Danos e rompimento da integridade da membrana basal, característica dos tumores invasivos, permite que os tumores se espalhem localmente e em locais distantes. As MMPs podem ser produzidas por células tumorais, células estromais do microambiente tumoral; tais como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (LIOTTA e KOHN 2001).

As proteínas da família das MMP também estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelação de tecidos (HOLMBECK et al. 2004). Em pesquisa com animais, foi sugerido um papel para a MMP14 e MMP2 na formação e ruptura do folículo ovariano (CURRY e OSTEN 2003). No crescimento folicular normal em seres humanos, o folículo expande a 400 vezes seu tamanho em aproximadamente duas semanas antes da ovulação. Isso requer remodelação coordenada da membrana basal do folículo e da matriz extracelular que o circunda.

VOS et al. (2014) conduziram um estudo que utilizou a imuno-histoquímica para determinar a presença de MMP14 e MMP2 em vários estágios do desenvolvimento folicular humano. Tanto MMP14 como MMP2 mostraram positividade das células epiteliais foliculares e ovariana, mostrando também positividade gradual com relação ao desenvolvimento do folículo. Uma possível explicação para marcação negativa de MMP14 no tecido normal avaliado no atual estudo foi a utilização de amostras de ovário normal provenientes de mulheres menopausadas submetidas a histerectomia e salpingectomia para retirada de leiomioma uterino

No câncer de ovário, os tumores primários, são em grande maioria, confinados aos ovários. Para que ocorra a metástase, as células tumorais passam por uma transição epitélio mesenquima para atingir a motilidade, subsequentemente, uma vez que as células cancerosas se separaram como células únicas ou aglomerados do tumor primário, pensa-se que elas metastatizam através de um mecanismo passivo, levado pelo movimento fisiológico do líquido peritoneal para o peritônio e omento (LENGYEL 2010; MASOUMI MOGHADDAM et al. 2012). A atividade proteolítica também é muito importante durante as metástases intraperitoneais das células tumorais, especialmente para o seu destacamento inicial da superfície do ovário (MOSS et al. 2009; LENGYEL 2010).

Para esse destacamento inicial ocorre a remodelação da matriz extracelular que conta com diversas enzimas e proteases, dentre elas as MMPs. Essa classe de proteínas pertence a uma família com mais de 26 enzimas que podem ser subdivididos em as collagenases, gelatinases, estromelisinases, e do tipo membranas (MT) (NAGASE e OKADA 1997). A proteína codificada pelo gene MMP14 é um

membro da subfamília MT (MT-MMP) considerada uma importante enzima de degradação de matriz e contém uma sequência transmembrana / citoplasmática que a confina a locais de microinvasão de células tumorais (LIOTTA e KOHN 2001). MMP14, também conhecida como MMP de membrana de tipo 1 (MT1-MMP), uma protease de domínio citoplasmático que contribui para o descolamento da célula tumoral oriunda do tumor primário em forma de pequenos implantes tumorais, iniciando o processo metastático (MOSS et al. 2009).

Nos nossos resultados das análises de expressão proteica co-localizada no epitélio das células tumorais, maiores valores de média e mediana da expressão de MMP14 se associou com ausência de necrose ($p = 0,004$), melhor status de desempenho ($p = 0,03$) e óbito ($p = 0,032$). Os resultados da avaliação proteica nos possibilitaram a análise conjunta ao estroma tumoral onde maiores valores de média e mediana da expressão de MMP14 estromal se associou com ausência de necrose ($p = 0,014$), estadiamento precoce da doença ($p = 0,023$) e pacientes não recidivadas ($p = 0,013$).

A atividade proteolítica da MMP14 é muito importante durante a metástase intraperitoneal no câncer de ovário. As células invadidas possuem enzimas proteolíticas importantes na degradação da matriz extracelular que aparecem em estruturas de superfície, chamadas de invadopodia (JACOB e PREKERIS 2015). NAKAHARA et al. (1997) mostrou que a superexpressão de MMP14 localizada na superfície dessas estruturas é a responsável por iniciar a cascata proteolítica de invasão celular. MMP2, uma metaloproteinase chave na metástase inicial do câncer de ovário (KENNY et al. 2008; KENNY e LENGYEL 2009) é dependente dessa cascata proteolítica. A MMP14 ancorada na membrana celular se liga ao TIMP2

através do seu domínio catalítico e depois o usa como receptor para pro-MMP2, uma proteína também produzida inicialmente pelas células estromais (NAGASE 1998).

A análise de sobrevida global e livre de doença de *MMP14* pelo *software KMPlotter* mostrou *MMP14* como um fator protetor nas amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau, com um valor de risco relativo de 0,61 (95% de Intervalo de confiança = 0,43 a 0,87) para sobrevida global ($p = 0,003$) e um risco relativo de 0,69 (95% de Intervalo de confiança = 0,49 a 0,96) para sobrevida livre de doença ($p = 0,056$) (Tabela 1). Essa análise de predição foi realizada com amostras seguindo as mesmas características clínicas do nosso estudo. TRUDEL et al. (2014) mostraram que altos níveis de expressão de *MMP14* avaliada pela análise digitalizada de imagem também foram significativamente associados a um menor risco de progressão. No nosso estudo, as curvas de Kaplan-Meier se dissociaram, porém não obtivemos uma diferença estatística pelo teste de Log-rank.

Esse comportamento protetor de *MMP14* pode ser consistente com uma expressão precoce de *MMP-14* no microambiente tumoral, visto que *MMP14* é a iniciadora da cascata das MMPs para invasão celular. Portanto, o alto nível de expressão de *MMP14* pode ser considerado apenas o reflexo do início da cascata de invasão, com outras MMPs envolvidas na progressão.

Os primeiros programas de desenvolvimento de fármacos baseados no bloqueio da angiogênese e metástase mediadas por MMP levaram ao aparecimento de uma série de inibidores de metaloproteinase e a ensaios clínicos de fase III, porém, alguns ensaios revelaram-se decepcionantes, uma vez que não conseguiram aumentar a taxa de sobrevida dos doentes com câncer (KESSENBROCK et al. 2010; GONG et al. 2014). Possíveis razões para a falha de bloqueadores de MMPs foram

amplamente discutidos por COUSSENS et al. (2002), que, discutiram a importância de alinharem os dados de estudos pré-clínicos que sustentam o papel da inibição de MMP como abordagem terapêutica juntamente aos dados clínicos a partir de uma perspectiva científica.

Nos ensaios clínicos, os inibidores da MMPs foram administrados em pacientes com câncer avançado com sobrevida ou tempo de progressão ao estágio final de um período ou processo (*endpoint*). Em contraste, nos modelos animais, a inibição de MMP é geralmente iniciada nos primeiros estágios da doença e mantida durante a progressão do tumor. O autor é taxativo quanto a efetividade do tratamento de pacientes com inibição de MMP no estágio avançado da doença, mostrando o impacto mínimo na sobrevida destas (COUSSENS et al. 2002).

Essa crítica aos estudos clínicos e a sua falha na eficiência em promover a sobrevida das pacientes em relação ao estadiamento da doença ilustra nossa hipótese e a perda da associação de MMP14 a agressividade e estadiamentos avançados da doença.

Em uma casuística variada, incluindo outros subtipos histológicos, a marcação com MMP14 diferenciou-se de acordo com os outros subtipos histológicos ($p < 0,001$). Atentando-se para a diferenciação biológica tumoral proposta no câncer de ovário (divisão da doença em tipo I e tipo II), carcinomas serosos de alto grau e tumores indiferenciados compõe o grupo do tipo II, seguido de características de alta malignidade como estadiamento avançado, altos índices proliferativos, rápida progressão e agressividade. Enquanto tumores do tipo I (reservados ao subtipo de baixo grau de malignidade, mucionos, endometrioides e células claras) têm a sua

apresentação em estadiamentos precoces, geralmente unilateral e com baixo grau de agressividade e proliferação celular (KURMAN e SHIH 2016)

Os dados da análise feita nas demais histologias (células claras, endometrióide, mucinoso, seroso baixo grau, seroso borderline, e misto) vão de acordo com esse parâmetro de doença do tipo I com perfil menos agressivo (tabela 14) podendo também ilustrar a hipótese de MMP14 atuando na metástase e invasão precoce. As curvas de sobrevida dessa mesma casuística tem um perfil diferente da curva das pacientes classificadas em carcinoma seroso de alto grau, mostrando que, mesmo não sendo estatisticamente significativas, as pacientes com maior expressão de MMP14 nesse subgrupo tendem a evoluir pior do que as pacientes com menores valores de MMP14 (considerando o ponto de corte a mediana <140) Figura 16.

Já o gene *PTGDS* identificado na nossa plataforma de expressão gênica foi a isoforma L do tipo lipocalina (L-PGDS) principalmente expresso no sistema nervoso central. Foi primeiro isolado no cérebro do rato pela análise da ligação do produto proteico de *PTGDS* a retinóides e dentre as vias relacionadas a esse gene encontram-se a via do metabolismo e síntese de eicosanóides (TANAKA et al. 1997). Nos órgãos genitais, *PTGDS* está envolvido na diferenciação de células de Sertoli, juntamente a proteína SOX9, assegurando sua diferenciação em número suficiente para induzir o desenvolvimento normal do testículo (WILHELM et al. 2007; PRITCHETT et al. 2011).

Sabe-se que as prostaglandinas são mediadores lipídicos secretados por vários tipos de células e derivadas do ácido araquidônico (AA). A síntese de PGD₂ começa com a ativação de fosfolipase A₂ (PLA₂) que catalisa a hidrólise do AA da membrana de fosfolípidos. A ação enzimática das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e

COX-2) sobre o ácido araquidônico produz uma endoperoxidase cíclica, PGG₂, que por sua vez dá origem a PGH₂, que é um substrato das diferentes enzimas que geram os prostanóides: tromboxanos e prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂ (SALVADO et al. 2012; GARCÍA-SOLAESA et al. 2016).

As prostaglandinas estão associadas à proliferação de alguns tipos de carcinomas, entre elas, a PGE₂, que estimula a proliferação de vários tipos de células cancerígenas (OSHIMA et al. 2006; GREENHOUGH et al. 2009) enquanto que o PGD₂ mostra efeitos antiproliferativos para células cancerosas. Uma vez sintetizado, PGD₂ é liberado da célula e é metabolizado em prostaglandinas da série J₂ (15-desoxi-12,14PGJ₂ e 12PGJ₂). Estes são sintetizados espontaneamente e não enzimaticamente, dependendo da presença de albumina sérica (OGUMA et al. 2008). Sabe-se que estes metabolitos derivados de enzimas produzidas pela PGD₂ (e subsequentes séries de compostos derivados de PGJ₂) atuam como reguladores do *feedback* negativo da transcrição do gene COX-2 – propostos como compostos promissores para o tratamento de alguns tumores (GURPINAR et al. 2013). Dessa forma, vários estudos tiveram como objetivo testar PGD₂ em meios de cultura de linhagem celular tumoral a fim de testar um efeito inibidor da proliferação celular.

Em 1986, KIKUCHI et al. mostraram o efeito inibitório dose dependente do crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo* da proteína PGD₂ em linhagem celular de carcinoma de ovário e melhora da sobrevida quando injetado PGD₂ em ratos transplantados. SU et al. (2001) investigaram pela primeira vez o perfil molecular do gene *PTGDS* em amostras de carcinoma de ovário juntamente com a análise morfológica por hibridização *in situ*, mostrando uma diferença significativa entre a expressão do gene e diferentes morfologias. Análises estatísticas dos nossos

resultados mostram a diferença entre os dois subgrupos histológicos ($p = 0,002$), Figura 11, com relação PGD2, caracterizando uma menor expressão proteica no grupo de amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau.

MALKI et al. (2007) elucidaram um mecanismo subjacente à inibição do crescimento tumoral mediada por PGD2 junto a SOX9 – componente característico do processo embrionário masculino também expresso em células de tumor de ovário humano e linhagens celulares de câncer de ovário, sugerindo o forte potencial da via PGD2/SOX9 como marcadores de diagnóstico para o câncer de ovário.

Nosso resultado de *microarray* mostrou *PTGDS* aumentado em pacientes recidivadas com relação a pacientes não recidivadas. Alguns estudos avaliaram apenas mRNA em amostras de câncer de ovário epiteliais e relataram expressão de *PTGDS* envolvido na progressão da doença (SU et al, 2001; BACHVAROV et al. 2006). Para melhor entendimento dos nossos resultados em expressão gênica, utilizamos o *software KMplotter* para a análise *in silico* da associação entre a expressão do gene *PTGDS* e as taxas de sobrevida em uma casuística maior de análise. Esta análise mostra que níveis elevados de mRNA de *PTGDS* se correlacionam com pior prognóstico na sobrevida livre de doença (HR: 1,5; $p = 0,0146$ – Tabela 1), resultado inverso observado na avaliação do produto proteico de *PTGDS* (PGD2) nos nossos resultados.

Também descrevemos um resultado inverso das 11 amostras arquivadas em material de parafina que foram utilizadas no ensaio de *microarray* comparadas com as demais amostras que compõem nossa casuística para avaliação proteica, no entanto, é obscuro concentrar-se em informações com base somente na expressão gênica.

Tem sido uma prática comum usar concentrações de mRNA para delegar concentrações e atividades das proteínas correspondentes, assumindo assim que altos níveis de transcritos são o principal determinante de níveis proteicos também. No entanto, podemos incluir vários pontos de controle da regulação transcricional e regulação pós-transcrição para a modificação final da proteína (VOGEL e MARCOTTE 2012), incluindo as influências reguladoras dos microRNAs que funcionam através da inibição da tradução efetiva de mRNA de genes alvo (BARTEL 2004).

YU et al. (2010) investigam o potencial papel dos miRNAs na quimioterapia do câncer em linhas de carcinoma de células escamosas e sua linhagem celular resistente a cisplatina. Entre os seus resultados, o miRNA518c foi relatado como níveis aumentados na linhagem celular resistente a cisplatina. Este miRNA, também localizado no cromossomo 9q, tem *PTGDS* como um suposto alvo. Essas evidências sugerem que os transcritos *PTGDS* podem possivelmente ser regulados por miRNAs, interferindo na quantidade final de proteínas, o que explicaria níveis desproporcionais entre *PTGDS* quando comparados a pacientes recidivadas ou não, juntamente ao seu produto proteico, PGD2.

No atual trabalho, a avaliação proteica de PGD2, foi visto uma diferença estatística nas curvas de sobrevida livre de doença ($p = 0,009$) e um valor de p marginal quando avaliado as curas de sobrevida global ($p = 0,071$) onde a expressão negativa a fraca de PGD2 apresentou pior prognóstico. Quando realizado o teste de Qui-quadrado a positividade de PGD2 esteve presente em 38,8% das pacientes sensíveis ao tratamento e negativo em 55% das pacientes resistentes a platina ($p = 0,04$).

Nosso estudo mostra uma mudança no perfil de expressão do gene *PTGDS*, pertencente a via de metabolismo de ácido araquidônico, juntamente ao seu nível proteico (PGD2). Esses achados sugerem uma versatilidade na função das prostaglandinas na fisiopatologia do câncer. Embora, no geral, uma expressão mais elevada de prostaglandinas possa levar a proliferação e inflamação aumentada, a expressão predominante de PGD2 pode retardar o crescimento celular e assim inibir a progressão de tumores.

Um crescente corpo de evidências sugere uma associação de Cox-2 com o desenvolvimento do tumor, agressividade, resistência à terapia padrão e resultado desfavorável do paciente (WANG et al. 2007). Uma possibilidade para PGD2 estar atuando como um fator protetor no câncer seria com relação à regulação do *feedback* negativo, não sendo suficientemente eficiente devido à ausência de PGD2 que regula negativamente a transcrição da proteína COX-2. PAYNE et al. (2008) mostraram em 2008 que a resposta a supressão do crescimento tumoral em glioblastoma foi aumentada com o tratamento a linhagens celulares A172 com PGD2 e inibidores de COX2, onde PGD2 além de inibir o crescimento tumoral, aumentou a sensibilidade aos fármacos anti-inflamatórios não-esteróides seletivos para COX-2.

É pensado que PGD2 e seu metabólito 15d-PGJ2 exerça esse efeito de supressão através do receptor $PPAR\gamma$ (*receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ*) (INOUE et al. 2000; KIM et al. 2005), receptor pertencente à família de ligantes ativadores de fatores de transcrição nuclear comumente expresso em macrófagos e desempenham um papel chave na regulação negativa da inflamação (TYAGI et al. 2011). STRAUS et al. (2000) mostraram que 15d-PGJ2 atua independente dos receptores $PPAR\gamma$, inibindo fatores endógenos de transcrição

(IKK), prevenindo a translocação de NFkB ao núcleo, agindo na transcrição dos seus genes alvos.

Em 2011, DE JONG et al. propuseram o efeito anticâncer de 15d-PGJ2 em um estudo utilizando a linhagem de carcinoma epitelial de ovário A2780/AD resistente a quimioterapia. Apesar da alta expressão de genes indutores de resistência como MDR1, Bcl2 e Bcl-xl, 15d-PGJ2 induziu fortemente a apoptose na linhagem celular estudada. Em conclusão, o estudo demonstrou que o metabolito de PGD2, 15d-PGJ2, possui um alto potencial terapêutico para induzir células tumorais resistentes a quimioterapia a apoptose.

O câncer de ovário continua a ser a causa mais comum de morte ginecológica relacionada ao câncer entre mulheres em países desenvolvidos. No entanto, subgrupos de pacientes com câncer de ovário experimentam uma sobrevida relativamente maior. Esforços para identificar fatores prognósticos que caracterizam esses pacientes estão em curso, com áreas de pesquisa, incluindo estudos de biomarcadores. Os principais aspectos do desenvolvimento de biomarcadores incluem um estudo cuidadoso e uma seleção de amostras para evitar viés, ensaios abrangentes e validação dos resultados. Nosso estudo enfrentou limitações quanto ao número de amostras utilizadas no ensaio de *microarray*, contudo obtivemos achados relevantes no cenário do câncer de ovário.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que o atual estudo identificou por expressão em larga escala 1149 genes diferencialmente expressos entre pacientes respondedoras e não respondedoras, relativo a um período de 2 anos de seguimento após a última infusão de platina. *MMP14* e *PTGDS* foram validados por meio de qRT-PCR, apresentando correlação entre as duas técnicas, comprovando assim os achados obtido pela técnica de expressão gênica em larga escala.

Os genes foram então avaliados quanto ao comportamento proteico em uma casuística maior de paciente com adenocarcinoma seroso de alto grau, onde *MMP14* não foi capaz de mostrar associação com parâmetros clínicos, anatomopatológicos e valores prognósticos nesse subtipo tumoral, porém se mostrando estatisticamente super-expressos em comparação com as demais histologias do câncer epitelial de ovário.

Já o gene *PTGDS*, codificador da proteína PGD2 apresentou-se como um potencial alvo molecular envolvido em diferentes desfechos de pacientes respondedoras e não respondedoras ao protocolo de tratamento quimioterápico, determinando melhores e mais acurados valores prognósticos neste subtipo tipo tumoral. Pacientes que tinham a marcação proteica para PGD2 apresentaram melhor sobrevida livre de doença mostrando também ser um marcador independente de bom prognóstico pela análise multivariada. Pacientes que responderam melhor a quimioterapia, (sensíveis à platina) apresentaram, significativamente, maiores níveis

dessa proteína. PGD2 também se diferenciou estatisticamente dos outros subtipos de câncer epitelial do ovário, demonstrando no nosso trabalho ser resultados específicos para o subtipo serosos de alto grau.

Embora permaneçam muitos desafios, a futura validação desse biomarcador e a sua eventual incorporação na prática clínica são promissoras para um melhor tratamento para pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. **J Pathol** 2010; 221:49-56.

Altinoz MA, Korkmaz R: NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase- inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. **Neoplasma** 2004; 51:239-47.

Armstrong DK. Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease. **Oncologist** 2002; 7 Suppl 5:20-8.

Baiocchi Neto G, Menezes ANO, Ribeiro ARG, et al. Ginecologia oncológica; câncer de ovário epitelial. In: Lopes A, Costa CML, Soares FA, et al. editores **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. 4ª ed. São Paulo: Âmbito Editores; 2017. p.229-34.

Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. **Adv Cancer Res** 2005; 94:29-86.

Berns EM, Bowtell DD. The changing view of high-grade serous ovarian cancer. **Cancer Res** 2012; 72:2701-4.

Bertagnolo V, Benedusi M, Querzoli P, et al. PLC-beta2 is highly expressed in breast cancer and is associated with a poor outcome: a study on tissue microarrays. **Int J Oncol** 2006; 28:863-72.

Bertagnolo V, Benedusi M, Brugnoli F, et al. Phospholipase C-beta 2 promotes mitosis and migration of human breast cancer-derived cells. **Carcinogenesis** 2007; 28:1638-45.

Bowen NJ, Logani S, Dickerson EB, Kapa LB, Akhtar M, Benigno BB, McDonald JF. Emerging roles for PAX8 in ovarian cancer and endosalpingeal development. **Gynecol Oncol** 2007; 104:331-7.

Casagrande JT, Louie EW, Pike MC, Roy S, Ross RK, Henderson BE. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. **Lancet** 1979; 2:170-3.

Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. **Cancer** 2003; 97:2631-42.

Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Ben-David Y, et al. Effect of BRCA1/2 mutations on long-term survival of patients with invasive ovarian cancer: the national Israeli study of ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26: 20-25.

Cho KR, Shih IM. Ovarian cancer. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:287-313.

Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, et al. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. **Sci Rep** 2016; 6:26191.

Choi JH, Choi KC, Auersperg N, et al. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:5508-16.

Colombo N, Van Gorp T, Parma G, et al. Ovarian cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2006; 60:159-79.

Cooke SL, Brenton JD. Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer. **Lancet Oncol** 2011; 12:1169-74.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR: The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. **Br J Cancer** 2002; 86:879-85.

Fader AN, Rose PG. Role of surgery in ovarian carcinoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:2873-83.

Fathalla MF. Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? **Lancet** 1971; 2:163.

Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. **Mol Cell Endocrinol** 2006; 247:4-21.

Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. **Cancers (Basel)** 2014; 6:1298-327.

Grant GM, Fortney A, Gorreta F, et al. Microarrays in cancer research. **Anticancer Res** 2004; 24:441-8.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res** 1994; 54:4855-78.

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis** 2009; 30:377-86.

Gross AL, Kurman RJ, Vang R, Shih IM, Visvanathan K. Precursor lesions of high-grade serous ovarian carcinoma: morphological and molecular characteristics. **J Oncol** 2010; 2010:126295.

Halkia E, Spiliotis J, Sugarbaker P. Diagnosis and management of peritoneal metastases from ovarian cancer. **Gastroenterol Res Pract** 2012; 2012:541842.

Havrilesky L, Darcy KM, Hamdan H, et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. **J Clin Oncol** 2003; 21:3814-25.

Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. **Mol Oncol** 2012; 6:140-6.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Tipos de câncer-ovário.** Disponível em: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>> [2017 jan 12]

Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. **J Biol Chem** 2000; 275:28028-32.

Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. **Lancet** 2014; 384:1376-88.

de Jong E, Winkel P, Poelstra K, Prakash J. Anticancer effects of 15d-prostaglandin-J2 in wild-type and doxorubicin-resistant ovarian cancer cells: novel actions on SIRT1 and HDAC. **PLoS One** 2011; 6:e25192.

Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, et al. Histological classification of ovarian cancer. **Med Electron Microsc** 2003; 36:9-17.

Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism** 2015; 64(3 Suppl 1):S16-21.

Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, et al. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1707-14.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:573-84.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell** 2010; 141:52-67.

Kim D, Kim S, Koh H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J** 2001; 15:1953-62.

Kim J, Yang P, Suraokar M, et al. Suppression of prostate tumor cell growth by stromal cell prostaglandin D synthase-derived products. **Cancer Res** 2005; 65:6189-98.

Konecny GE, Wang C, Hamidi H, et al. Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. **J Natl Cancer Inst** 2014; 106(10).

Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. **Am J Pathol** 2009; 174:1597-601.

Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. **Int J Gynecol Pathol** 2008; 27:151-60.

Kurman RJ, Shih IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:433-43.

Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. **Ann Oncol** 2013; 24 Suppl 10:x16-21.

Kurman RJ, Shih IM. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. **Am J Pathol** 2016; 186:733-47.

Laury AR, Hornick JL, Perets R, Krane JF, Corson J, Drapkin R, Hirsch MS. PAX8 reliably distinguishes ovarian serous tumors from malignant mesothelioma. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:627-35.

Lausen B, Medical Biometry. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 73-85.

Leamon CP, Lovejoy CD, Nguyen B. Patient selection and targeted treatment in the management of platinum-resistant ovarian cancer. **Pharmgenomics Pers Med** 2013; 6:113-25.

Ledermann JA, Kristeleit RS. Optimal treatment for relapsing ovarian cancer. **Ann Oncol** 2010; 21 Suppl 7:vii218-22.

Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum- sensitive relapsed ovarian cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:1382-92.

Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:852-61.

Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. Homologous recombination deficiency and ovarian cancer. **Eur J Cancer** 2016; 60:49-58.

Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. **Am J Pathol** 2010; 177:1053-64.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31.

Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. **Nat Genet** 1993; 5:279-82.

Malpica A, Deavers MT, Lu K, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:496-504.

Matulonis UA, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed serous ovarian cancer and a BRCA mutation: Overall survival adjusted for postprogression poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibitor therapy. **Cancer** 2016; 122:1844-52

Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. **Nat Rev Dis Primers** 2016; 2:16061.

Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:812-22.

McCabe N, Turner NC, Lord CJ et al: Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. **Cancer Res** 2006; 66:8109-15

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science** 1994; 266:66-71.

Mok SC, Bell DA, Knapp RC, et al. Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. **Cancer Res** 1993; 53:1489-92.

Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. **Development** 2009; 136:1813-21.

Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. **Gynecol Oncol** 2009; 112:40-6.

Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol Proced Online** 2006; 8:175-93.

Nalejska E, Mączyńska E, Lewandowska MA. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. **Mol Diagn Ther** 2014; 18:273-84.

[NIH] National Institute for Health and Clinical Excellence. **Guidance on the use of paclitaxel in the treatment of ovarian cancer**. Last updated: 01 May 2005. Available from: <URL:<https://www.nice.org.uk/guidance/ta55>> [2017 jul 12].

Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1459-67.

Nonaka D, Chiriboga L, Soslow RA. Expression of pax8 as a useful marker in distinguishing ovarian carcinomas from mammary carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:1566-71.

Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a001107.

Oshima H, Matsunaga A, Fujimura T, Tsukamoto T, Taketo MM, Oshima M. Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. **Gastroenterology** 2006; 131:1086-95.

Ozcan A, Shen SS, Hamilton C, Anjana K, Coffey D, Krishnan B, Truong LD. PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. **Mod Pathol** 2011; 24:751-64.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:221-33.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. **Virchows Arch** 2012a; 460:237-49.

Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. **Ann Oncol** 2012b; 23 Suppl 1:x111-7.

Pritchett J, Athwal V, Roberts N, Hanley NA, Hanley KP. Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development. **Trends Mol Med** 2011; 17:166-74.

Qin LX, Beyer RP, Hudson FN, Linford NJ, Morris DE, Kerr KF. Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. **BMC Bioinformatics** 2006; 7:23.

Rescigno P, Cerillo I, Ruocco R, Condello C, De Placido S, Pensabene M. New hypothesis on pathogenesis of ovarian cancer lead to future tailored approaches. **Biomed Res Int** 2013; 2013:852839.

Rodgers LH, Ó hAinmhire E, Young AN, Burdette JE. Loss of PAX8 in high-grade serous ovarian cancer reduces cell survival despite unique modes of action in the fallopian tube and ovarian surface epithelium. **Oncotarget** 2016; 7:32785-95.

Rosen DG, Yang G, Liu G, et al. Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. **Front Biosci (Landmark Ed)** 2009; 14:2089-102.

Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. **Oncogene** 2003; 22:6497-507.

Salvado MD, Alfranca A, Haeggström JZ, Redondo JM. Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2. **Trends Mol Med** 2012; 18:233-43.

Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **Am J Pathol** 2004; 164:1511-8.

Shyu RY, Wu CC, Wang CH, et al. H-rev107 regulates prostaglandin D2 synthase-mediated suppression of cellular invasion in testicular cancer cells. **J Biomed Sci** 2013; 20:30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:7-30.

Smith MF, Ricke WA, Bakke LJ, Dow MP, Smith GW. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Mol Cell Endocrinol** 2002; 191:45-56.

Stratton JF, Pharoah P, Smith SK, Easton D, Ponder BA. A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer. **Br J Obstet Gynaecol** 1998; 105:493-9.

Tavassoli F, Devilee P. **WHO histological classification of tumours of the ovary**. WHO; 2003. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs; p.117-145. (World health Organization Classification of Tumours).

Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nat Genet** 1996; 12:333-7.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. **Nature** 2011; 474:609-15.

Trifonov I, Todorova M, Uzunova Zh. Hereditary ovarian cancer. **Akush Ginekolog** 2001; 41 Suppl 4:3-7.

Trudel D, Desmeules P, Turcotte S, et al. Visual and automated assessment of matrix metalloproteinase-14 tissue expression for the evaluation of ovarian cancer prognosis. **Mod Pathol** 2014; 27:1394-404.

Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. **Adv Anat Pathol** 2009; 16:267-82

Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell** 2002; 108:171-82.

Vos MC, van der Wurff AA, Last JT, et al. Immunohistochemical expression of MMP-14 and MMP-2, and MMP-2 activity during human ovarian follicular development. **Reprod Biol Endocrinol** 2014; 12:12.

Wallstrom G, Anderson K, LaBaer J. Biomarker discovery for heterogeneous diseases. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2013; 22:

Wang M, Brown DP, You J, Bemis KG. Putative surrogate biomarkers to predict patients with acquired platinum resistance in ovarian cancer. **J Mol Biomarkers Diagnosis** 2014; 5:4-11.

Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2017; 41:3-14.

Werness BA, Eltabbakh GH. Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features. **Int J Gynecol Pathol** 2001; 20:48-63.

Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Mol Biol Cell** 2014; 25:2677-81.

Winterhoff B, Hamidi H, Wang C, et al. Molecular classification of high grade endometrioid and clear cell ovarian cancer using TCGA gene expression signatures. **Gynecol Oncol** 2016; 141:95-100.

Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. **Am J Epidemiol** 1992; 136:1184-203.

Wu L, Dai ZY, Qian YH, et al. Diagnostic value of serum human epididymis protein 4 (HE4) in ovarian carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Int J Gynecol Cancer** 2012; 22:1106-12.

Zhang D, Brodt P. Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. **Oncogene** 2003; 22:974-82.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 22 de maio de 2014.

**Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha.**

Aluna: Mariana Rezende Alves (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1863/14

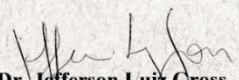
“Estudo de genes diferencialmente expressos em carcinomas serosos de ovário de pacientes responsivas ou não a quimioterapia”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/03/2014, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/02/2014, aprovaram a realização do projeto em referência (datado de 27 de fevereiro de 2014) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Ginecologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1