

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
CARCINOMAS SEROSOS DE ALTO GRAU DE
PACIENTES COM DISTINTAS EVOLUÇÕES
CLÍNICAS**

NAYRA SOARES DO AMARAL

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

**São Paulo
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Amaral, Nayra Soares do

Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em carcinomas serosos de alto grau de pacientes com distintas evoluções clínicas / Nayra Soares do Amaral - São Paulo, 2018.

110p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. Cistadenocarcinoma Seroso/Cystadenocarcinoma, Serous. 2. MicroRNAs/MicroRNAs. 3. Evolução Clínica/Clinical Evolution. 4. Neoplasias Ovarianas/Ovarian Neoplasms. 5. Quimioterapia Combinada/Drug Therapy. Combination. 6. Recidiva/Recurrence

DEDICATÓRIA

Agradeço e dedico este trabalho a todas as pacientes com câncer de ovário, durante o doutorado pude compreender o quão complexa é esta doença, espero que um dia possamos entender e contribuir um pouco mais com a dor de vocês.

“E um vaga-lume lanterneiro que riscou um psiu de luz”.

(Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rafael Malagoli Rocha, obrigada por abrir portas e me mostrar a direção, com o seu apoio tive coragem de tomar grandes decisões e mudar o meu destino.

Aos meus amigos de laboratório, mesmo aqueles com quem o convívio foi pouco, Iara, Bia, Fernanda, Júlio, Erica, André, e em especial aos amigos do projeto de câncer de ovário, Mariana, Felipe e Natália, construir hipóteses, responder perguntas e criar objetivos foi possível porque vocês colaboraram de perto. Muito obrigada!

Ao departamento de patologia, em especial a Dra. Louise que participou desde o início, compartilhando seus conhecimentos e contribuindo sempre para a realização deste projeto. Dra. Claudia Camilo, Kátia e Elisangela, obrigada pelo apoio científico e amizade. Aos caros Severino e Carlos.

Aos amigos do Laboratório Neogene, Helen, Mateus e Fabio.

Agradeço também ao corpo clínico, em especial ao Dr. Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa e ao Dr. Glauco Baiocchi Neto.

Dr. Calin and friends from Experimental Therapeutic Lab, I have no words to thank you! Dr. Calin taught me at each meeting the love for science and how to look at each generated result. Thank you is not enough for Enrique, Cristina, Simone, BaoQing, Ana Carolina, Xiao, Recep, Masa, Linda, Maitri, Katrien and Keish. Thank you for the collaboration and friendship.

Obrigada aos amigos Frederico e Melissa, Houston sem vocês não teria graça.

Aos funcionários da pós-graduação e aos funcionários da biblioteca.

Obrigada aos meus pais e meus irmãos, que me apoiaram e entenderam que tomar a decisão de vir para São Paulo me fortaleceu e me permitiu acreditar que podemos mudar o nosso destino. Obrigada por entenderem a minha ausência e mesmo assim serem tão presentes. Vocês são essenciais na minha vida e são a alegria dos meus dias. Eu amo vocês.

Às minhas sobrinhas, Laura e Luísa, vocês tornam a minha vida mais leve e cheia de amor. Obrigada por cada beijinho, eles alegam a alma.

Ao meu amado marido Bruno, você sonhou esse sonho comigo e encarou os desafios do meu lado. Obrigada por ser o melhor companheiro que eu poderia ter.

Agradeço a Deus, pois quanto mais me aproximo da ciência mais vejo que nada sei e mais reconheço a sua grandeza.

Agradeço à FAPESP/CAPES pelo apoio financeiro do processo de doutorado fluxo contínuo 2014/03021-1 e pelo processo BEPE 2016/09349-4.

RESUMO

Amaral NS. **Identificação de microRNAs diferencialmente expressos em carcinomas serosos de alto grau de pacientes com distintas evoluções clínicas.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O tratamento do câncer epitelial de ovário é baseado na combinação de cirurgia e quimioterapia (principalmente carboplatina e paclitaxel). Embora o tratamento seja eficiente em 80% dos casos, a taxa de sobrevida de 5 anos é baixa devido à alta taxa de recorrência e resistência ao tratamento medicamentoso. Os processos moleculares que influenciam na resposta terapêutica e mecanismos que acarretam na sobrevida das pacientes ainda não são completamente compreendidos, e por este motivo, torna-se necessário a identificação de moléculas que possibilitem a melhor compreensão. Muitos estudos relatam a importância dos miRNAs no desenvolvimento e progressão do câncer de ovário, entretanto, tendo em vista a heterogeneidade do câncer ovariano, este estudo se diferencia por selecionar uma casuística clinicamente homogênea. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil da expressão de miRNAs em amostras clinicamente homogêneas de adenocarcinoma seroso de alto grau, a fim de identificar miRNAs que estão envolvidos no processo de resistência ao tratamento quimioterápico e capazes de diferenciar pacientes com distintas evoluções clínicas. **Metodologia:** Foram selecionadas trinta e três amostras de adenocarcinoma seroso de ovário de alto grau, provenientes do banco de tumores do A.C.Camargo Cancer Center, oriundas de cirurgia com ressecção ótima cujas pacientes tinham estadiamento III e passaram por acompanhamento clínico mínimo de 2 anos. Destas 25 amostras foram provenientes de tumor primário, 8 de metástases primárias pareadas de pacientes que apresentaram recidiva e 5 amostras de epitélio de tuba de falópio de pacientes sem histórico de câncer como controle normal. A identificação dos miRNAs diferencialmente expressos nas pacientes com distintos desfechos clínicos foi realizada através da plataforma de larga escala de expressão de miRNAs humanos (*G4870A – ID 031181*; 8x60K, *Agilent Technologies*). As probes foram filtradas e normalizadas

utilizando o software BRB ArrayTool (v. 4.4.0). Os alvos foram preditos usando miRWalk 2.0 (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/custom.html>), em quatro diferentes algoritmos (miRWalk, RNA22, miRanda and Targetscan). Para a análise do perfil entre miRNAs e transcritos codificadores, 415 amostras foram obtidas do The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) e essa interação foi submetida a um teste de correlação de Pearson. Os miRNAs diferencialmente expressos em diferentes desfechos clínicos foram validados pela técnica de *in situ hybridization* (ISH) em 114 amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau incluídas no TMA proveniente do departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo e em diferentes amostras provenientes do TCGA. Os alvos dos miRNAs validados foram associados a sobrevida global e livre de doença em amostras do TCGA e confirmados em amostras contidas no TMA da casuística interna através da técnica de Imuno-histoquímica. **Resultados:** A análise de comparação da expressão diferencial de miRNAs entre controle normal e de seroso de alto grau seroso demonstrou que 365 miRNAs foram diferencialmente expressos e foram encontradas 613 interações inversamente correlacionadas. Os miRNAs miR-934 e miR-143 foram associados a pior sobrevida global em nossa casuística, o miR-503-5p com resistência a quimioterapia. Apenas o miR-934 foi validado no TCGA e pela técnica de ISH. O alvo *FZD3* foi predito para o miR-934 e miR-143 e foi negativamente correlacionado com ambos miRNAs em células tumorais de ovário. A expressão da proteína FZD3 por imuno-histoquímica demonstrou que esse receptor não foi expresso na membrana celular e sim no citoplasma e núcleo nos tumores de alto grau seroso. **Conclusão:** Diversos miRNAs tem participação na progressão do tumor de ovário. O miR-934 foi encontrado aumentado nas amostras metastática e em tumores primários e foi associado a pior sobrevida global, bem como o aumento citoplasmático de FZD3, alvo do miR-934, contudo este não foi associado a expressão de Beta-catenina. Sugere-se assim que outras vias de sinalização possam estar envolvidas neste contexto.

Descritores: Cistadenocarcinoma Seroso. MicroRNAs. Evolução Clínica. Neoplasias Ovarianas. Quimioterapia Combinada. Recidiva

SUMMARY

Amaral NS. [**Identification of microRNAs differentially expressed in high grade serous carcinomas of patients with different clinical evolutions**]. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The treatment of epithelial ovarian cancer is based on the combination of surgery and chemotherapy (mainly carboplatin and Paclitaxel). Although treatment is effective in 80% of cases, the 5 year survival rate is low due to the high recurrence rate and drug treatment resistance. The molecular processes that influence the therapeutic response and mechanisms that lead to the patient's survival are not yet fully understood, and for this reason, it becomes necessary to identify molecules that allow the best understanding. Many studies report the importance of miRNAs in the development and progression of ovarian cancer, however, in view of the heterogeneity of ovarian cancer, this study differs by selecting a clinically homogeneous casuistic. In this context, the objective of the present study was to characterize the profile of the expression of miRNAs in clinically homogeneous samples of high-grade serous adenocarcinoma, in order to identify miRNAs that are involved in the process of resistance to chemotherapeutic treatment and able to differentiate patients with different clinical developments. **Methodology:** A total of 33 specimens of high-grade ovary adenocarcinoma were selected from the tumor Bank of the A C Camargo Cancer Center, extracted from surgery with optimal resection whose patients had staging III and passed through clinical accompaniment of at least 2 years. Of these 25 samples were derived from primary tumor, 8 from primary metastasis of relapsed patients (paired) and 5 samples from fallopian epithelium tube of patients with no history of cancer as normal control. The identification of MiRNAs differentially expressed in patients with different clinical outturns was performed through the large-scale human miRNAs expression platform (G4870A – ID 031181; 8x60K, Agilent Technologies). The probes have been filtered and normalized using the BRB ArrayTool Software (v. 4.4.0). The targets were predicted using MiRWalk 2.0 (<http://www.umm.uni->

heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/custom.html), in four different algorithms (MiRWalk, RNA22, MiRanda and Targetscan). For the profile analysis between MiRNAs and transcribed coders, 415 samples were obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) and this interaction was subjected to a Pearson correlation test. The MiRNAs differentially expressed in different clinical outcomes were validated by the *in situ* hybridization (ISH) technique in 114 samples of high-grade serous adenocarcinoma included in the TMA from the Department of Anatomina Patologica A.C.Camargo Hospital and in different samples from the TCGA. The targets of the validated miRNAs were associated with global survival and disease-free in samples of the TCGA and confirmed in samples contained in the TMA of the internal casuistic through the technique of Imunohistoquimica. **Results:** The comparison analysis between normal control and high degree serous demonstrated that 365 miRNAs were differentially expressed and were found 613 interactions inversely correlated. The MiRNAs mir-934 and mir-143 were associated with worse global survival in our casuistic, the mir-503-5p with chemotherapy resistance. Only the MiR-934 was validated in TCGA and ISH technique. The FZD3 target was predicted for the mir-934 and mir-143 and was negatively correlated with both miRNAs in ovarian tumor cells. The expression of the FZD3 protein by Imunohistoquimica demonstrated that this receptor was not expressed in the cellular membrane but in the cytoplasm and nucleus in the high-degree serous tumors. **Conclusion:** Several miRNAs have participation in the ovarian tumor progression. The mir-934 was found increased in the metastatic samples and in primary tumors and was associated with worse global survival, as well as the cytoplasmic increase of FZD3, target of the MiR-934, however this was not associated with the expression of Beta-catenin. It is suggested, thus, that other pathways may be involved in this context.

Key-words: Cystadenocarcinoma, Serous. MicroRNAs. Clinical Evolution. Ovarian Neoplasms. Drug Therapy/Combination. Recurrence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frequência de novos casos de câncer de ovário de acordo com a idade de diagnóstico. Adaptado de OCRFA 2018.....	2
Figura 2	Origens celulares dos cânceres de ovário	3
Figura 3	Via canônica da biogênese de miRNAs.....	14
Figura 4	Representação da casuística deste estudo	24
Figura 5	Fluxograma dos principais resultados deste estudo	37
Figura 6	Teste de distribuições de sobrevivência entre pacientes com citorredução ótima e citorredução sub-ótima.....	38
Figura 7	Imuno-histoquímica positiva para P53 e Ki67 nas tubas de falópio com presença de NIT	39
Figura 8	Valores de RIN do RNA total.....	40
Figura 9	PCA entre as amostras normais x amostras tumorais x amostras metastáticas. B. Análise de Cluster hierárquico não supervisionada.....	41

Figura 10 O hsa-miR-150-5p apresentou aumento de expressão em tumores recorrentes.....	42
Figura 11 O miRNA hsa-miR-503-5-p como preditor de resposta de quimioterapia (CT)	44
Figura 12 Validação da associação entre a alta expressão de hsa-miR-934 e a pior sobrevida global e livre de doença em pacientes com câncer de ovário provenientes do TCGA.....	46
Figura 13 Aumento da expressão do hsa-miR-143-3p em pacientes que morreram em até seis meses em comparação com pacientes que não morreram em até 2 anos após o diagnóstico em duas distintas plataformas provenientes do banco de dados do TCGA.....	47
Figura 14 Expressão do hsa-miR-934 e do cluster do miR-143/miR-145 no câncer de ovário.....	49
Figura 15 Expressão da Glicoproteína-P (MDR1) apenas nas linhagens resistentes ao paclitaxel, SKOV3-TR e HEYA8-MDR.....	50
Figura 16 Expressão do hsa-miR-934 e hsa-miR-123-3p em células normais e tumorais de ovário	52
Figura 17 Expressão do hsa-miR-503-5p em células normais e tumorais de ovário	53

Figura 18 Expressão do hsa-miR-143-3p em células normais e tumorais de ovário, em monócito e macrófago	54
Figura 19 Expressão do cluster miR143/miR145 em exossomos de THP1	55
Figura 20 Expressão de hsa-miR-143-3p em células HEYA8 tratadas com exossomos de THP1 e em co-cultura de células SKOV3 e THP1	57
Figura 21 Expressão do hsa-miR-934 no câncer de ovário e no tecido normal, e impacto da expressão do hsa-miR-934 na sobrevida global das pacientes com câncer de ovário	59
Figura 22 Expressão do hsa-miR-934 em células tumorais e fibroblastos.....	60
Figura 23 Comparação da expressão do hsa-miR-934 entre tumores primários e metastáticos de ovário.....	62
Figura 24 Vias envolvidas em genes preditos como alvos do hsa-miR-934.....	63
Figura 25 Expressão do gene FZD5 associado com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global de pacientes com câncer de ovário do TCGA.....	64
Figura 26 Sobrevida global de pacientes com câncer de ovário do banco de dados do TCGA de acordo com a expressão do gene FZD3 e a correlação negativa entre o gene FZD3 e os miRNAs (miR-934 E miR-143-3p)	66

Figura 27 Transfeccão com antagomiR dos miRNAs (hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p) e a expressão dos genes alvo FZD5 e FZD3 antes e após a transfeccão	67
Figura 28 Expressão de FZD3 em pacientes de adenocarcinoma seroso de alto grau	69
Figura 29 Expressão citoplasmática de FZD3 em pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau	69
Figura 30 Expressão genica e proteica de CTNNB1 em células normais e tumorais de ovário	71
Figura 31 Expressão proteica de Beta-catenina	72
Figura 32 Curva de sobrevida global e livre de doença em pacientes com adenocarcinoma de ovário associadas com a expressão de Beta-catenina	72
Figura 33 Expressão de beta-catenina em grupos positivos e negativos para a marcação de FZD3 nuclear	73
Figura 34 Correlação positiva entre FZD3 e RNF43 em pacientes com câncer de ovário de banco de dados TCGA	74
Figura 35 Modelo hipotético da Regulação de FZD3. Os miRNAs, miR-934 e miR-143-3p, regulam negativamente a expressão do gene FZD3.....	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Características das linhagens celulares	31
Quadro 2	Sequência dos primers utilizados neste trabalho	34
Tabela 1	Características clínico patológicas das pacientes incluídas na expressão global de miRNAs deste estudo	39
Tabela 2	Intervalo livre de platina como fator preditivo	44
Tabela 3	Correlação entre a expressão do miR-934 entre as células tumorais e fibroblasto do microambiente tumoral.....	61
Tabela 4	Alvos preditos do miR-934 negativamente correlacionados	63
Tabela 5	Alvos preditos do miR-934 negativamente correlacionados	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of Variance
CAFs	Fibroblastos associados ao cancer
HER2	Receptor-2 do factor de crescimento epidérmico humano
IL-21	Interleucina 21
IM	Índice mitótico
IP	Invasão perineural
µL	Microlitro
A2780	Linhagem de célula epitelial de adenocarcinoma sensível a platina
A2780-CP20	Linhagem de célula epitelial de adenocarcinoma resistente a platina
AGO	Argonaute
ARID1A	At-rich interactive domain-containing protein 1a
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
CA125	Cancer antigen 125
Camk1d	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina id
CT	Quimioterapia (chemotherapy)
CTNNB1	Beta-catenina
CTNNB1	Catenin beta 1
DFS	Disease free survival
DGCR8	Digeorge critical region 8
DLDA	Análise diagonal linear discriminante
DMSO	Dimetilssulfóxido
DROSHA	Drosha Ribonuclease III
EOC	Carcinoma epitelial de ovário
FDA	Food and drug administration
FDR	False discovery rate
FIGO	Federação internacional de ginecologia e obstetria
FZD	Receptores de frizzled

FZD3	Frizzled class receptor 3
FZD5	Frizzled class receptor 5
GPCRs	Proteína-G
HEYA8	Linhagem de célula epitelial de adenocarcinoma sensível a paclitaxel
HEYA8-MDR	Linhagem de célula epitelial de adenocarcinoma resistente a paclitaxel
HGSC	High grade serous carcinoma
HIO180	Linhagem de célula epitelial normal de ovário
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
HNF	Hnf1 homeobox a and b
INCA	Instituto nacional de cancer
IPA	Ingenuity pathway analysis
ISH	<i>in situ</i> hybridization
IVL	Invasão vascular linfática
IVS	Invasão vascular sanguínea
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOOCV	Validação cruzada leave-one-out
MDR	Resistência a múltiplas drogas
miRNAs	microRNAs
mRNAs	Rna mensageiro
MSI2	Musashi rna binding protein 2
NCCN	National comprehensive cancer network
NFκB	Nuclear factor kappa b
Ng	Nanograma
NOVA1	Nova alternative splicing regulator 1
OCRFA	Ovarian cancer research fund allience
OS	Overall survival
PARP	Inibidores da polimerase poly-adp-ribose
PCA	Principal component analysis
PD-L1	Inibidor de morte programada do ligante 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

qRT-PCR	PCR em tempo real
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RIN	Rna integrity number
RNF43	Ring finger protein 43
ROMA	Algoritmo de malignidade ovariana
SBK1	Sh3 domain binding kinase 1
SKOV3	Linhagem de célula epitelial de células-claras sensível ao paclitaxel
SKOV3-TR	Linhagem de célula epitelial de células-claras resistente ao paclitaxel
SLC35B4	Solute carrier family 35 member b4
TCGA	The cancer genome atlas
THP1	Linhagem de monócito humano
TMA	Tissue microarray
TNFSRF11A	TNF Receptor Superfamily Member 11a
TP53	Tumour protein 53
TP73	Tumor protein p73
VANGL2	Vangl planar cell polarity 2
XPO5	Exportina-5

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de Ovário	1
1.1.1	Estatísticas sobre o Câncer de Ovário.....	1
1.1.2	Tipos de Câncer de Ovário.....	2
1.1.3	Câncer de Ovário Epitelial.....	3
1.1.4	Origem dos Adenocarcinomas de Ovário	5
1.1.5	Fatores de Risco	7
1.1.6	Diagnostico	7
1.1.7	Tratamentos.....	9
1.1.7.1	Cirurgia	9
1.1.7.2	Quimioterapia	10
1.1.8	Fatores Prognósticos	12
1.2	miRNAs	13
1.2.1	Biogênese dos miRNAs.....	13
1.2.2	miRNAs e Câncer	15
1.2.3	miRNAs como Alvo Terapêutico	16
1.2.4	miRNAs como Biomarcadores	16
1.2.5	miRNAs e o Câncer de Ovário	17
1.3	Exossomos	18
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo Geral.....	20
3.2	Objetivos Específicos.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Submissões ao Comitê de Ética	22
4.2	Levantamento da Casuística.....	22

4.3	Revisões de Lâminas e a Coleta de Dados Clínicos	24
4.4	Extração e a Qualidade do RNA Total.....	25
4.5	Plataforma <i>Agilent</i>	26
4.6	Análises.....	27
4.6.1	Métodos de Análise da Expressão Global miRNAs	27
4.6.2	Comparações Analisadas	28
4.6.3	Previsão do Alvo do miRNA	28
4.6.4	Análise de Vias <i>In Silico</i>	29
4.6.5	Associação entre a Expressão de miRNAs e Resposta ao Tratamento e Prognóstico	29
4.7	Validação de Estudo Transversal.....	29
4.8	Cultivo Celular.....	30
4.9	Western Blotting	31
4.10	Extração de Exosomos de Meios de Cultura Celular.....	32
4.11	Co-Cultura.....	32
4.12	Transfecção com Antagomir.....	33
4.13	Extração de RNA e Análises de Expressão	33
4.14	<i>in Situ Hybridization</i>	34
4.15	Imuno-Histoquímica	35
4.16	Análise Estatística	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Resumo dos Resultados	37
5.2	Caracterização dos Dados Clínicos e Anatomopatológicos.....	38
5.3	Qualidade do RNA.....	40
5.4	Diferença de Expressão dos miRNAs.....	40
5.4.1	Perfil de Expressão de miRNAs em Câncer de Ovário	40
5.4.2	Normal X Tumor.....	42
5.4.3	Tumor Primário X Metástase.....	42
5.4.4	Diferentes Desfechos Clínicos.....	43
5.4.4.1	miRNAs Diferencialmente Expressos entre Pacientes Recidivadas e não Recidivadas em 6 Meses após a Quimioterapia	43

5.4.4.2	miRNAs Diferencialmente Expressos entre Pacientes Recidivadas de acordo com o Intervalo Livre de Platina	43
5.4.4.3	miRNAs e Prognostico	45
5.5	Validação dos miRNAs pelo Banco de Dados do “The Cancer Genome Atlas” (TCGA).....	45
5.5.1	Validação dos miRNAs Associados com Pior Prognostico.....	45
5.5.2	Comparação da Expressão dos miRNAs miR-934, Cluster-Mir-143-3p entre amostras Normais e Tumorais.....	47
5.6	Linhagens Celulares de Ovário	50
5.7	Expressão de miRNAs em Linhagens Celulares de Ovário.....	51
5.7.1	Expressão de miRNAs Associados ao Pior Prognostico, miR-934 e miR-143-3p	51
5.7.2	Expressão do miR-503-5p Associado a Quimiorresistência.....	52
5.7.3	Expressão do miR-143-3p em THP1	53
5.7.4	Expressão do miR-143-3p em Exosomo de THP1	54
5.7.5	Transferência do miR-143-3p através de THP1	56
5.8	Validação dos miRNAs pela Técnica de Hibridização <i>in Situ</i> (ISH) de miRNA.....	58
5.9	Alvos do miR-934.....	62
5.10	Transfecção	67
5.11	Imuno-Histoquímica de FZD3	68
5.12	Beta Catenina e o Câncer de Ovário	70
6	DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÃO	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ANEXO

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

APÊNDICES

- Apêndice 1** Tabela Suplementar 1 - Comparação entre controle normal e adenocarcinoma seroso de alto grau primário
- Apêndice 2** Tabela suplementar 2 – Expressão dos miRNAs hsa-miR-143-3p e hsa-miR-934 associada ao tempo de sobrevida livre de Doença e sobrevida global.
- Apêndice 3** Tabela suplementar 3-Expressão das proteínas FZD3 e Beta-catenina associada ao tempo de sobrevida livre de doença e a sobrevida global.

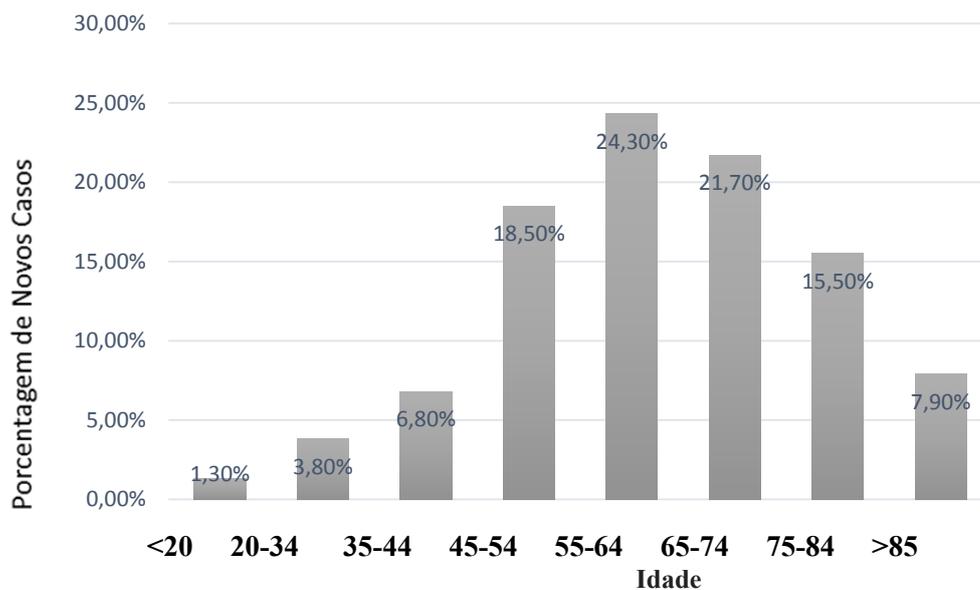
1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE OVÁRIO

1.1.1 Estatísticas sobre o Câncer de Ovário

As estatísticas mais recentes da Sociedade Americana de Câncer estimaram para o ano de 2018 aproximadamente 22,240 novos casos diagnosticados de câncer de ovário e 14,070 mortes nos Estados Unidos. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa de novos casos para o Brasil foi de 6,150 e 3,283 mortes para o ano de 2018 (Ministério da Saúde 2018). A incidência de pacientes com câncer de ovário pode variar nas diferentes regiões do Brasil, sendo que as ocorrências deste tumor em Porto Alegre e São Paulo são de 11/100.000 (FERREIRA et al. 2012).

De acordo com a Aliança de Fundo de Pesquisa do Câncer de Ovário – *Ovarian Cancer Research Fund Alliance* (OCRFA), o risco de uma mulher desenvolver o câncer de ovário invasivo é de 1 em 79 e o risco de morte 1 em 109. A incidência do câncer de ovário é mais alta em mulheres de 55 a 64 anos e a idade média de diagnóstico é de 63 anos (Figura 1).



Fonte: Adaptado de OCRFA (2018).

Figura 1 - Frequência de novos casos de câncer de ovário de acordo com a idade de diagnóstico.

1.1.2 Tipos de Câncer de Ovário

Os diferentes tipos de câncer de ovário são classificados de acordo com o tipo celular a partir do qual se originou. Os tipos de câncer de ovário podem ser divididos em três principais grupos de acordo com sua morfologia e comportamento biológico (PRAT e FIGO Committee on Gynecologic Oncology 2015) (Figura 2).

- 1) Carcinoma epitelial de superfície
- 2) Carcinoma de células germinativas
- 3) Carcinomas de células estromal

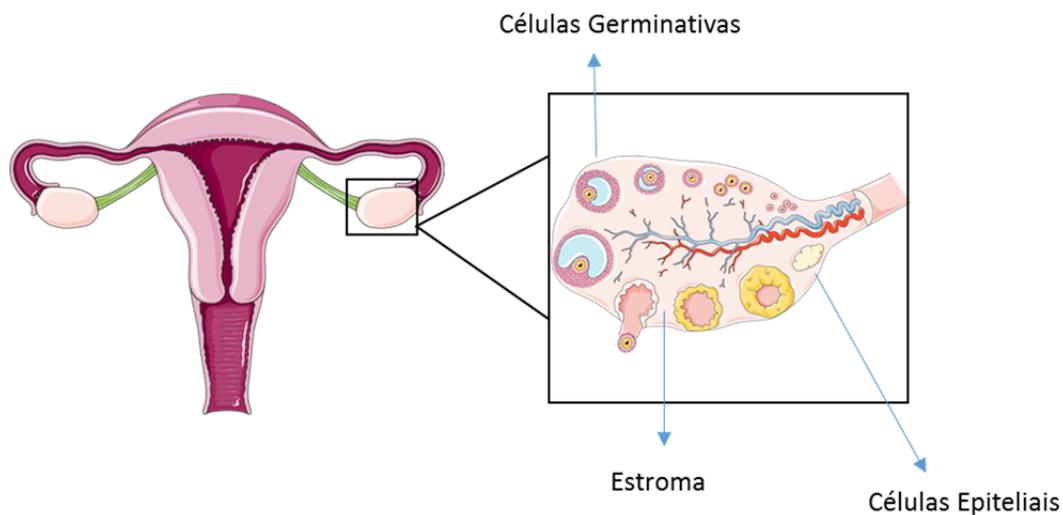


Figura 2 - Origens celulares dos cânceres de ovário.

1.1.3 Câncer de Ovário Epitelial

Aproximadamente 90% dos cânceres de ovário são de origem epitelial (PRAT e FIGO Committee on Gynecologic Oncology 2015) e de acordo com a Organização Mundial de Saúde 2014, os cânceres epiteliais podem ser classificados como: seroso, mucinoso, endometriode e de células claras (MEINHOLD-HEERLEIN et al. 2016).

Adenocarcinoma Seroso - Dentre os carcinomas de ovário, o tumor seroso é o mais prevalente, atingindo aproximadamente 75% dos casos. Os tumores serosos podem ser classificados quanto ao grau de diferenciação. Dentre os neoplasmas serosos, existem dois subgrupos que se diferem molecularmente; o adenocarcinoma seroso de baixo grau- *Low Grade Serous Carcinoma* (LGSC) e o adenocarcinoma seroso de alto grau - *High Grade Serous Carcinoma* (HGSC). Os carcinomas de baixo grau apresentam crescimento lento e são associados aos tumores borderline (tumores benignos que podem se desenvolver em tumores malignos,

aproximadamente 5% dos casos) e frequentemente são relacionados a mutações em *BRAF* (v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B) e genes da família RAS (HRas, KRas, and NRas). Diferentemente do carcinoma seroso de baixo grau, os carcinomas serosos de alto grau são altamente associados a mutações no gene de TP53 (Tumour Protein 53) e BRCA 1 e 2 (Breast Cancer 1 And 2) (DAVIDSON e TROPÉ 2014).

Tumores Mucinosos – Os tumores mucinosos são menos frequentes e compreendem cerca de 3 a 4% dos casos de câncer de ovário (PRAT e FIGO Committee on Gynecologic Oncology2014). Estes são frequentemente mutados para *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) e HER2 (V-Erb-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2) (PRAT 2012).

Tumores Endometrioides - Dentre os casos de câncer de ovário, aproximadamente 10% são diagnosticados como endometrióide (PRAT e FIGO Committee on Gynecologic Oncology2014). Pacientes com este tipo de tumor têm alta frequência de mutação nos genes *PTEN* (Phosphatase And Tensin Homolog), *CTNNB1* (beta-catenina) e *ARID1A* (AT Rich Interactive Domain). A síndrome de Lynch, câncer colorretal hereditário não poliposo, é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de tumores endometrioides (PRAT 2012).

Tumores de Células Claras - Aproximadamente 10% dos tumores de ovário são do tipo de células claras (PRAT e FIGO Committee on Gynecologic Oncology2014). As mutações frequentemente encontradas neste tipo de tumor estão presentes nos genes HNF (HNF1 Homeobox A and B) e também em *ARID1A* (PRAT 2012).

Os diferentes tipos tumorais apresentam diferentes mutações e respostas à quimioterapia, indicando que cada tipo tumoral é uma doença que necessita ser tratada de forma diferente.

1.1.4 Origem dos Adenocarcinomas de Ovário

Atualmente, ainda não há consenso sobre a origem do tumor de ovário, acredita-se que a procedência da carcinogênese possa ser de alterações malignas do epitélio de superfície ovariano (FATHALLA 1971), ou a partir do desenvolvimento anormal do epitélio da trompa de Falópio (ERICKSON et al. 2013).

A origem proveniente da superfície do epitélio do ovário é a hipótese mais antiga e tem sido associada com a elevada frequência da ovulação. Repetidas rupturas e reparos epiteliais promovem o aumento da proliferação celular, metaplasia e o acúmulo de mutações que favorecem o surgimento do processo neoplásico (FATHALLA 1971; FLEMING et al. 2016). Além disso, sugere-se também o papel dos hormônios no dano epitelial da superfície do ovário (DAMIÃO et al. 2007; SALEHI et al. 2008). A observação de que as mulheres que usam contraceptivos orais baseados em progesterona-estrógeno têm uma probabilidade de 30-60% menor de desenvolver este tipo de tumor, reforça a hipótese de que o epitélio de superfície do ovário é a origem da neoplasia neste sítio (MOORMAN et al. 2013). A teoria da estimulação pela gonadotrofina foi postulada por Cramer e Welch (1983), citado por PIEK et al. (2004, p.719), que hipotetizam que o excesso da gonadotrofina estimula diretamente o epitélio do ovário e o estrógeno o estimula indiretamente, levando a um acúmulo de danos no reparo do DNA e a estimulação da proliferação celular.

Além da teoria da carcinogênese ovariana (FATHALLA 1971; FLEMING et al. 2016), estudos apresentam a hipótese de que os carcinomas de ovário também possam possuir origem nas tubas de falópio (KURMAN 2013). Durante os anos de 1990 e 2000, houve um aumento nas medidas profiláticas nas quais mulheres com mutações germinativas em BRCA1 e BRCA2 retiraram as trompas de falópio e na análise desses materiais revelaram-se a ausência de lesões ovarianas e a presença de carcinomas não invasivos e invasivos ocultos nas trompas de falópio, mais tipicamente nas fimbrias (MEDEIROS et al. 2006; KURMAN 2013). Além disso, trabalhos de expressão gênica apoiam esta hipótese. O perfil de expressão dos tumores serosos de alto grau possui maior semelhança com o epitélio da trompa de Falópio do que com o epitélio de ovário (TONE et al. 2008; KURMAN 2013). Uma vez que o epitélio da superfície do ovário e do epitélio da trompa de Falópio apresentam uma origem embrionária comum e são ambos afetados pela ovulação, é difícil distinguir se um ou ambos os tecidos dão origem ao câncer de ovário (BERNARDO et al. 2015).

Nem sempre é possível delinear a origem do tumor primário (ovário, tuba ou peritônio). Sendo assim, a nova classificação FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia), identifica o estadiamento I como tumores confinados ao ovário e tubas de falópio e estadiamento II como os tumores que envolvem um ou ambos os ovários e tubas de Falópio com extensão pélvica ou câncer primário no peritônio. O estadiamento III se dá com a confirmação histológica de metástase no peritônio e linfonodos retroperitoneais e o estadiamento IV com metástases a distância (PRAT e FIGO Committee on Gynecologic Oncology 2015).

1.1.5 Fatores de Risco

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer de ovário hereditário é o histórico familiar, quanto maior o número de parentes de primeiro e segundo grau afetados pela doença maior será este risco (HOLSCHNEIDER e BEREK 2000). Aproximadamente 15-25% dos casos apresentam mutação em BRCA1 e BRCA2, estas mutações aumentam o risco do desenvolvimento do tumor (RAMUS et al. 2012). Entretanto estudos têm demonstrado que pacientes mutadas para BRCA1 e BRCA2 podem apresentar maior sensibilidade ao tratamento quimioterápico baseado em platina (GORODNOVA et al. 2015).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação do câncer de ovário com diversos fatores de risco, tais como o uso de tabaco, exposição à radiação, história prévia de doença inflamatória pélvica, síndrome dos ovários policísticos e endometriose (HOLSCHNEIDER e BEREK 2000).

Mulheres com câncer de mama apresentam 30% de risco para o desenvolvimento de segundo câncer primário, particularmente para câncer de endométrio e de ovário (LI et al. 2018). O grupo com câncer de mama do subtipo estrógeno e progesterona positivos apresentou uma diminuição no risco de desenvolver um segundo câncer de ovário (HOLSCHNEIDER e BEREK 2018).

1.1.6 Diagnóstico

O câncer de ovário é o câncer ginecológico mais difícil de se diagnosticar e com menor chance de cura (Ministério da Saúde 2018). Aproximadamente 75% dos casos são diagnosticados em estágio avançado, uma vez que o câncer de ovário não apresenta sintomas específicos. A taxa de sobrevivência de pacientes diagnosticadas

inicialmente é de 80-90%, já quando o diagnóstico é feito tardiamente a taxa de sobrevivência é de apenas 15-20%. Tendo em vista a importância do diagnóstico precoce, reforça-se a necessidade da identificação de um marcador preciso capaz de auxiliar na triagem do câncer de ovário (FERRARO et al. 2013).

O marcador tumoral CA125 (Cancer Antigen 125) é o mais utilizado no acompanhamento da progressão do câncer de ovário, entretanto, a sensibilidade e especificidade deste marcador não são ideais. Os níveis de CA125 são elevados em aproximadamente 80% de todos os cânceres de ovário epiteliais e em apenas 50% naqueles em estágio I do EOC (Carcinoma epitelial de ovário) (T VAN GORP et al. 2011).

De acordo com o manual de ginecologia oncológica do A.C. Camargo Cancer Center, em pacientes com menos de 50 anos o aumento de CA-125 está associado a tumores malignos em menos de 25% dos casos e em pacientes com idade acima de 50 anos este aumento está associado com tumores malignos em 80% dos casos. O aumento do CA-125 também é associado com o estadiamento clínico do carcinoma, sendo frequente em 50% dos casos no estadiamento I, 90 % no estadiamento II, 92 % no estadiamento III e 94 % no estadiamento IV. Além disso, o CA-125 não é específico de câncer e também pode estar alterado em doenças inflamatórias pélvicas, leiomiomas, gravidez e endometriose.

Devido à baixa sensibilidade do CA-125 este marcador não é utilizado sozinho. Atualmente, o risco do valor do algoritmo de malignidade ovariana (ROMA) é utilizado para prever o risco de câncer de ovário e é calculado pelas medições quantitativas de HE4 (Human Epididymis Secretory Protein 4) e CA125. A

associação do marcador HE4 e CA125 ajuda a predizer a malignidade, uma vez que auxilia a distinguir a massa benigna do câncer (JEONG et al. 2017).

1.1.7 Tratamentos

Apesar de o câncer de ovário ser a causa mais comum de morte dentre os tumores ginecológicos, poucas melhorias e descobertas têm sido realizadas para a busca de um melhor tratamento. Nos Estados Unidos, em 1985, 40% das mulheres com câncer de ovário sobreviviam por 5 anos e nos tempos atuais essa taxa passou para 45% (HOLMES 2015).

O tratamento de primeira escolha do câncer epitelial de ovário se dá pela cirurgia e quimioterapia baseada na combinação de carboplatina e paclitaxel. A diretriz de 2010 da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomenda que o tratamento para a maioria das pacientes com câncer de ovário avançado seja a cirurgia e pelo menos seis ciclos de quimioterapia sistêmica.

1.1.7.1 Cirurgia

O objetivo da citorredução cirúrgica é a ressecção de toda doença visível. Dentre os vários fatores prognósticos, a doença residual é considerada em diversos estudos como um dos mais importantes. O envolvimento da citorredução ótima sobre o prognóstico tem sido extensivamente relatado na literatura, com um benefício na sobrevida em diversos estudos prospectivos, retrospectivos e não randomizados, sendo descrito pela primeira vez por GRIFFITHS em 1975. A identificação de lesões >1 cm, no exame basal após a citorredução, tem um aumento significativo do risco de progressão da doença (ESKANDER et al. 2018).

A citorredução é classificada como primária quando o procedimento é realizado antes da quimioterapia, como citorredução de intervalo após algum ciclo de quimioterapia, e secundária quando é realizada após a recidiva da doença (FADER e ROSE 2007).

1.1.7.2 Quimioterapia

O tratamento para pacientes em estadiamento avançado após a citorredução é a quimioterapia baseada em platina. A terapia baseada em platina, foi introduzida no final dos anos 1970 e continua sendo o padrão nos dias atuais, pois apresenta um baixo perfil de toxicidade (VAUGHAN et al. 2012).

O esquema mais comum realizado após a cirurgia é a associação de carboplatina com paclitaxel (PICCART et al. 2000). Nos últimos anos, a doxorrubicina lipossomal tornou-se comumente usada em combinação com a carboplatina, principalmente no tratamento de recidivas (VAUGHAN et al. 2012).

Atualmente o tratamento do câncer de ovário mudou, pois nem todas as pacientes são candidatas a cirurgia de citorredução ótima seguida de quimioterapia, devido à grande massa tumoral nos estadiamentos avançados. Nessa situação, a quimioterapia neoadjuvante seguida por cirurgia de intervalo é uma opção de tratamento, uma vez que a quimioterapia é administrada para reduzir a carga tumoral antes que a cirurgia seja realizada. Apesar de o tratamento neoadjuvante melhorar as taxas de citorredução ótima, este pode não melhorar a sobrevida global das pacientes com câncer de ovário (QIN et al. 2018).

Outras alternativas de tratamento para pacientes com doença avançada são: o esquema de carboplatina e paclitaxel em dose densa, a associação de bevacizumabe (CHAN et al. 2016) e a quimioterapia intraperitoneal (TEWARI et al. 2015).

Recentemente, os inibidores da polimerase Poly-ADP-Ribose (PARP) são um dos grupos mais estudados para o tratamento do câncer de ovário recorrente. O Olaparib foi a primeira droga a ser aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos como terapia de manutenção pós-resposta à quimioterapia à base de platina para o câncer de ovário recorrente em mulheres com mutação BRCA1 / 2. O *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o Olaparib como monoterapia em linha de tratamento no câncer ovariano avançado, com mutação deletéria da linhagem germinativa BRCA1 / 2 (MUSELLA et al. 2018).

O bloqueio de checkpoints imunológicos tornou-se também uma das abordagens mais promissoras para ativar a imunidade antitumoral. Em 2016, três novos medicamentos foram aprovados para o tratamento de tumores sólidos, dentre estes está o atezolizumab, o primeiro inibidor de morte programada do ligante 1 (PD-L1) (KNEPPER et al. 2017). Atualmente tem se avaliado o papel de atezolizumab no câncer de ovário em estudo Clínico de Fase III, multicêntrico e randomizado em 3 grupos: Grupo A (Quimioterapia + Bevacizumab + Placebo) Grupo B: (Quimioterapia + Bevacizumab + Atezolizumab) e Grupo C: (Bevacizumab + Atezolizumab) em pacientes diagnosticados no estágio III ou estágio IV de ovário, trompa de Falópio ou câncer primário peritoneal (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03353831). Apesar dos avanços sobre o tratamento do câncer de ovário, ainda não está bem estabelecido quais grupos podem se beneficiar das imunoterapias.

1.1.8 Fatores Prognósticos

O pior prognóstico em pacientes com câncer epitelial de ovário é atribuído à detecção tardia e a resistência à quimioterapia (KRIVAK et al. 2014). A sobrevivência de 5 anos em mulheres diagnosticadas antes dos 65 anos e sem o acometimento de metástase é de 92% das pacientes. No entanto, apenas 15% dos cânceres de ovário são encontrados nesta fase inicial (American Cancer Society-ACS 2013).

Existem estudos que consideram que a melhoria na mortalidade se dá em parte pela redução da incidência de câncer de ovário. Especula-se que esta diminuição seja devido ao uso de contraceptivos orais e diminuição do uso de hormônio pós-menopausa (EISENHAUER 2017).

A ressecção completa de toda a doença macroscópica no momento da cirurgia foi definida como o fator prognóstico independente mais importante em carcinoma de ovário avançado (ZIVANOVIC et al. 2007).

Os fatores prognósticos podem ser divididos em três fragmentos: fatores do paciente, fatores do tumor e fatores do tratamento (XU et al. 2013). Sabe-se que devido à heterogeneidade do câncer de ovário, algumas pacientes submetidas às mesmas condições de tratamento manifestam recaídas e metástases (DAVIDSON et al. 2013). Torna-se importante a compreensão de eventos moleculares que predizem o prognóstico e que possam se tornar novas opções terapêuticas em pacientes não responsivas à quimioterapia. Muitos estudos têm demonstrado a atuação dos miRNAs na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais envolvidos na etiologia do câncer de ovário (CHEN et al. 2013).

1.2 miRNAS

Os microRNAs (miRNAs) são necessários para processos biológicos fundamentais, são pequenos RNAs (aproximadamente 22 pares de base) não-codificantes que medeiam a repressão de sequências específicas de RNA mensageiro (mRNAs) inibindo a expressão do gene alvo no nível pós-transcricional (JOHANSSON et al. 2018). Um miRNA pode regular a expressão de centenas de RNAm e centenas de miRNAs podem regular apenas um RNAm (ZAMAN et al. 2012; KINOSE et al. 2014).

A modulação de aproximadamente 60% da expressão de todos os genes humanos se dá pelos miRNAs, que podem estar envolvidos em vias de sinalização do ciclo celular, fatores de transcrição, processos biológicos de desenvolvimento, diferenciação, metabolismo, inflamação e sistema imunológico (KINOSE et al. 2014; ZHU et al. 2016).

1.2.1 Biogênese dos miRNAS

A expressão de miRNAs maduros é mediada por várias enzimas, sendo o primeiro passo da biogênese do miRNA, da via canônica, a transcrição do gene de miRNA pela RNA polimerase II ou RNA polimerase III em transcritos primários (pri-miRNA), que contêm uma estrutura de loop. Em seguida, duas enzimas, DROSHA (Drosha Ribonuclease III) e “DiGeorge critical region 8” (DGCR8), reconhecem o loop do pri-miRNA, que é cortado em um miRNA precursor (pré-miRNA). Os pré-miRNAs têm aproximadamente 70 nucleotídeos e são transportados do núcleo para o citoplasma através da exportina-5 (XPO5) e são posteriormente

processados em miRNAs maduros (21 nt). No citoplasma, os pré-miRNAs, em dupla fita, são processados pela Dicer e por outras proteínas, o duplex de miRNA então é estabilizado pela proteína Argonaute (AGO) e o miRNA maduro é integrado a um complexo silenciador mediado por miRNA (miRISC) que suprime a expressão de genes alvo, que são degradados, desestabilizados ou apresentam tradução inibida (AMARAL et al. 2016) (Figura 3).

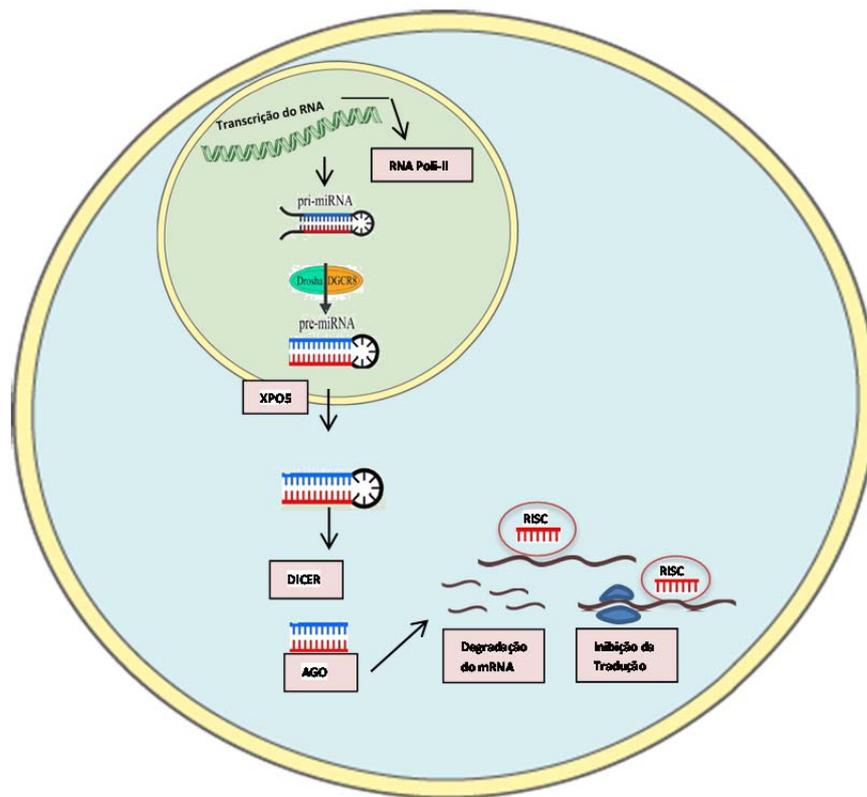


Figura 3 - A via canônica dos miRNAs se inicia pela transcrição do gene do miRNA, que gera o pri-miRNA, e será processado pela enzima Drosha, em pre-miRNA. O pre-miRNA é translocado para o citoplasma pela Exportina 5, onde é processado pela enzima Dicer, gerando o duplex de miRNA. O Complexo RISC e o miRNA maduro interagem com mRNA alvo, onde ocorre a inibição da tradução ou degradação do mRNA.

Recentemente foi demonstrado que a cisplatina prejudica o processamento do miR-200-b, diminuindo assim a expressão do miR-200b maduro em células de câncer de ovário. Interessantemente, foi demonstrado que este pode ser mais um mecanismo de resistência à quimioterapia, onde a maturação dos miRNAs pode ser um importante alvo da cisplatina (MEZENCEV e WARTELL 2018).

1.2.2 miRNAs e Câncer

No início de 1993, LEE et al., pela primeira vez, descreveram um pequeno RNA não-codificante que regula a tradução de mRNA através de interação de RNA-RNA complementar. Quase uma década depois, CALIN et al. (2002) demonstraram pela primeira vez que as deleções ou hipoexpressão dos miRNAs miR-15a e miR16-1 foram encontradas em aproximadamente 68% dos pacientes com leucemia linfocítica crônica. Desde então, muitos pesquisadores têm demonstrado a participação dos miRNAs em vários tipos de cânceres. A maioria dos genes dos miRNAs foram identificados em sítios frágeis e regiões com perdas de heterozigidade associadas ao câncer (CALIN et al. 2004).

Os miRNAs podem ter o papel de oncogene ou supressor tumoral, dependendo do tecido e do contexto que estão expressos. A alteração da expressão dos miRNAs pode ser influenciada por mutações no DNA que afetem a transcrição genica dos miRNAs, fatores epigenéticos e modificação em histonas, além de mudanças em moléculas da via da biogênese dos miRNAs, como Dicer e Drosha (TUNA et al. 2016).

1.2.3 miRNAs como Alvo Terapêutico

Uma nova abordagem tem sido estudada em relação aos miRNAs em tumores. Grande número de experimentos em modelos animais revelou que os miRNAs podem suprimir múltiplas vias oncogênicas, sendo o tratamento com miRNAs em tecidos tumorais uma estratégia eficaz. Diversos ensaios clínicos utilizando miRNAs como tratamento já foram iniciados. Estudos pré-clínicos com miR-34a e miR-16 em vários tipos de câncer abriu o caminho para ensaios clínicos, entretanto, os ensaios clínicos utilizando miR34a foram ineficazes devido a efeitos tóxicos adversos (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT01829971, NCT02862145). Em contrapartida, o estudo de fase I utilizando o TargomiR ou MesomiR-1 (mimic do miR-16) em mesotelioma pleural de pacientes de câncer de pulmão de células não pequenas de foi recentemente concluído com sucesso. Os estudos irão continuar em combinação com a quimioterapia ou imunoterapia (NCT02369198) (VAN ZANDWIJK et al. 2017).

1.2.4 miRNAs como Biomarcadores

A expressão exossomal dos miRNAs, miR-200b e miR-200c, foi encontrada aumentada em pacientes com estágio FIGO III – IV, incluindo metástase linfonodal, em comparação com pacientes com FIGO I-II, sugerindo que estes microRNAs podem estar envolvidos com a progressão tumoral. Além disso, o miR-21-3p exossomal foi associado a resistência de cisplatina (CHENG et al. 2017).

Outro biofluido importante para a detecção dos miRNAs é a urina. Dados de microarray de miRNA mostram que o miR-30a-5p foi aumentado e 37 miRNAs diminuídos nas amostras de urina de pacientes com adenocarcinoma seroso de ovário

quando comparados aos controles saudáveis. O aumento do miR-30a-5p na urina foi associado com a fase inicial da doença e com metástase linfática, sendo um potencial marcador de diagnóstico de adenocarcinoma seroso ovariano (ZHOU et al. 2015).

1.2.5 miRNAs e o Câncer de Ovário

A primeira análise da expressão global dos miRNAs em carcinoma de ovário foi realizada por IORIO et al. (2007). Eles observaram que os miRNAs miR-141, miR-200a, miR-200b, e miR-200c estavam hiperexpressos nos tumores quando comparado ao tecido normal, e os miRNAs miR-125b1, miR-140, miR-145, e miR-199a estavam hipoexpressos (PRAHM et al. 2016).

A desregulação dos miRNAs das famílias do let-7 e miR-200 é frequentemente relatada em estudos com câncer de ovário e ambas famílias possuem miRNAs que regulam genes envolvidos com a transição epitélio mesênquima (PRAHM et al. 2016). Foi visto também que a baixa expressão do miR-29 aumentou a resistência do tratamento com cisplatina em cultura celular de câncer de ovário, sugerindo que o aumento da expressão do miR-29 pode sensibilizar o tratamento de cisplatina (YU et al. 2013). Além da resistência à quimioterapia, recentemente, o aumento da expressão do miR-493-5p foi associado também à resistência de platina e inibidores de PARP em pacientes mutados para BRCA2, tendo como mecanismo a alteração da expressão de alvos da via de reparo (MEGHANI et al. 2018). A baixa expressão proteica de Dicer teve um valor prognóstico no carcinoma de ovário, uma vez que a menor sobrevida global das pacientes foi associada com a diminuição de Dicer (FAGGAD et al. 2009).

Atualmente, os diferentes tipos histológicos de carcinoma de ovário estão sendo distinguidos como doenças diferentes. Já foi visto que a expressão de miRNAs gera distintas assinaturas em diferentes subtipos histológicos e estadiamentos e que os mecanismos moleculares de progressão também se distinguem (CALURA et al. 2013).

Sabendo-se da importância dos miRNAs na patologia do câncer de ovário (MEINHOLD-HEERLEIN et al. 2016) e que estes tumores são heterogêneos e se diferem em relação às características patológicas, etiológicas, prognósticas e moleculares, nosso estudo teve como objetivo avaliar a expressão de miRNAs em um grupo de amostras clinicamente homogêneas com distintas evoluções clínicas.

1.3 EXOSSOMOS

Os exossomos são pequenas vesículas que podem variar entre 40 e 100 nm. Estas vesículas receberam destaque nas pesquisas atuais por apresentarem um papel na comunicação entre as células. Os exossomos derivados de tumor servem como meio de transporte para proteínas, mRNAs e miRNAs e transmitem sinais direcionados da célula primária para locais distantes por meio de transferência horizontal ou interação com a célula-receptor. Tendo em vista o papel dos exossomos no processo metastático, muitos estudos têm buscado explorar as funções dos exossomos nos tumores com o objetivo de direcionamento terapêutico. Além disso, os exossomos podem desempenhar um papel crucial no auxílio ao diagnóstico e respostas preditivas uma vez que estes apresentam informações **moleculares dos tumores** (WEE et al. 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Alguns estudos vêm demonstrando a importância dos miRNAs envolvidos no processo de resistência ao tratamento quimioterápico. Todavia, os grupos são compostos por diferentes histologias, estadiamentos clínicos ao diagnóstico e até mesmo por doença residual após a cirurgia. Tendo em vista que as diferentes histologias apresentam distintas etiologias, e que o estadiamento e a citorredução primária são importantes fatores que influenciam no prognóstico, selecionamos amostras homogêneas a fim de avaliarmos o papel dos miRNAs na evolução clínica de pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de expressão e o papel funcional de miRNAs em um grupo homogêneo de tumores de ovário em pacientes com distintas evoluções clínicas, pacientes responsivas ao tratamento ou não, de modo a identificar miRNAs diferencialmente expressos e seus possíveis alvos gênicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Associar o perfil de expressão de miRNAs, em amostras homogêneas de tumores de ovário, com relação à dados clínicos
- 2 Comparar a diferença de expressão de miRNAs entre tecido normal x tumor primário x recidiva primária no peritônio
- 3 Validar os miRNAs eleitos com expressão diferenciada entre pacientes de diferentes desfechos clínicos.
- 4 Busca *in silico* pelos potenciais alvos dos miRNAs diferencialmente expressos nas comparações entre os diferentes grupos de distintas evoluções clínicas
- 5 Investigar o papel dos principais miRNAs diferencialmente expressos por transfecção dos miRNAs miméticos ou anti-miRNAs em uma linhagem celular de ovário

- 6 Avaliar, antes e após transfecção, a expressão gênica dos alvos dos miRNAs selecionados por PCR quantitativo em tempo real e protéica através de ensaios imunocitoquímicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBMISSÕES AO COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do A.C.Camargo Cancer Center, com o número de protocolo 1873/14. (Anexo 1)

4.2 LEVANTAMENTO DA CASUÍSTICA

Optamos por utilizar amostras em parafina por haver maior disponibilidade de casos do que em tecido a fresco. As amostras foram selecionadas a partir do acervo dos Arquivos do departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. Acredita-se que os miRNAs sofram menor interferência da fixação do formol e da adição da parafina do que os mRNAs, por serem moléculas pequenas e estáveis (KOLBERT et al. 2013). Sendo assim, para este estudo foram selecionados 339 blocos de parafina de pacientes com câncer de ovário de forma retrospectiva do período de 2000 a 2013.

A análise de sobrevida global das 339 pacientes foi avaliada para diferentes variáveis prognósticas.

Sabe-se também que a biologia tumoral e que a carcinogênese dos vários tipos histológicos envolve distintas vias de evolução e se comportam como doenças diferentes, uma vez que o perfil biológico e o *background* genético são distintos (SKIRNISDOTTIR e SEIDAL 2013). A fim de minimizarmos diversas

interferências na evolução clínica das pacientes, nosso estudo selecionou amostras homogêneas de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- 1- Pacientes com adenocarcinoma seroso de ovário de alto grau,
- 2- Pacientes com estadiamento clínico III,
- 3- Pacientes sem tratamento neoadjuvante,
- 4- Pacientes com citorredução ótima
- 5- Pacientes tratadas com agentes de platina e taxanos
- 6- Pacientes sem histórico familiar de câncer de ovário e mama
- 7- Pacientes com *follow up* mínimo de 2 anos,
- 8- Metástase primária das pacientes recidivadas

Das 339 amostras encontradas no acervo do banco da anatomia patológica do Hospital AC Camargo, obtivemos 41 blocos incluídos nos nossos critérios. Após a revisão das lâminas, excluímos 16 casos por falta de material biológico ou por falta de informações clínicas necessárias para o estudo. Sendo assim, obtivemos no total 25 amostras de tumor primário. Também fizemos a expressão dos miRNAs por hibridização em 10 amostras de metástases primárias pareadas e em um grupo controle de 5 amostras de epitélio tubário de pacientes sem histórico de câncer para compor o grupo normal.

Para a construção do TMA (Tissue microarray), além das 25 amostras de tumor primário, também foram incluídas amostras de estadiamento clínico IV e amostras de pacientes que não apresentaram citorredução ótima, totalizando 114 amostras.

Para a validação de amostras independentes, também foram avaliadas amostras do banco de dados do TCGA (The Cancer Genome Atlas). Toda a casuística deste estudo foi resumida (Figura 4)

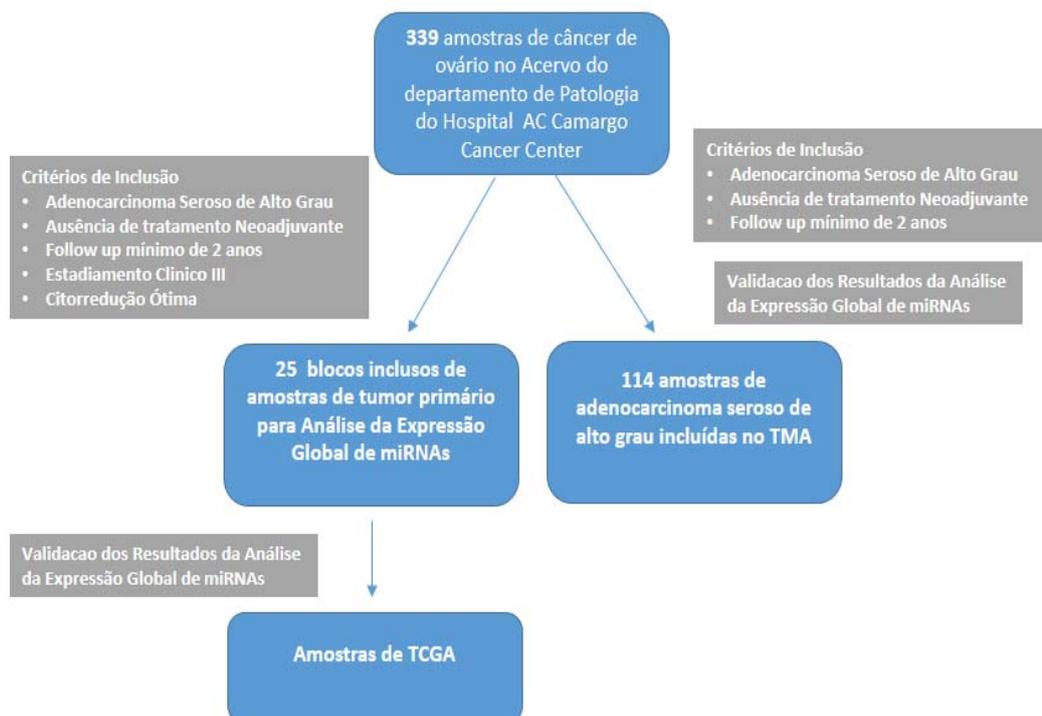


Figura 4 - Representação da casuística deste estudo.

4.3 REVISÕES DE LÂMINAS E A COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Após a seleção dos casos incluídos, as revisões das lâminas foram realizadas com a supervisão de uma patologista para a confirmação da histologia, dos achados anatomopatológicos e para a seleção da melhor área tumoral para a extração do RNA.

Uma das hipóteses mais bem aceitas sobre a origem do adenocarcinoma seroso de ovário é que este se desenvolve a partir de uma lesão precursora intra-epitelial na trompa de Falópio (NIT) (KURMAN 2013). Sendo assim, a presença destas lesões precursoras na tuba uterina foi avaliada e confirmada pela técnica de imuno-histoquímica com marcação de P53 e Ki67 (marcador de proliferação Ki67). As informações clínicas e anatomopatológicas foram coletadas após as revisões das lâminas e das buscas em prontuários eletrônicos.

4.4 EXTRAÇÃO E A QUALIDADE DO RNA TOTAL

Após a revisão das lâminas e seleção da melhor área representativa do tumor, as amostras foram cortadas em 4 cortes de 10 µm para a macrodissecção e em seguida foi realizada a extração do RNA total. A extração foi feita de acordo com as instruções do kit da empresa Ambion (RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues (Ambion - Applied Biosciences, Austin, TX). Este kit foi escolhido por demonstrar performance superior em análises de expressão de miRNAs com uso de material parafinado (DOLESHAL et al. 2008). Após a extração, as amostras foram armazenadas em um freezer a -80°C.

A concentração e pureza das amostras do RNA total foram medidas através do espectrofotômetro NanoDrop ND3.0 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE) e a integridade do RNA por meio de chips para RNAs pequenos da Agilent 12 no 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

4.5 PLATAFORMA AGILENT

A avaliação da expressão dos miRNAs foi feita através da plataforma *Agilent Human miRNA Microarray* (G4872A – ID 046064; 8x60K, Agilent Technologies). Os ensaios de expressão de miRNA da Agilent integram oito *microarrays* individuais em um slide único vidro. Cada microarray inclui aproximadamente 60 k que contem sondas originadas do banco de dados público miRBASE. Essa plataforma é coberta por 2006 *probes* para miRNAs humanos.

O RNA tumoral e do tecido normal foram processados utilizando o Kit Ambion (RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues (Ambion - Applied Biosciences, Austin, TX). Para a realização do microarray, dois microlitros (100 ng) de RNA total [na concentração de 50 ng/ μ L diluídos em Tris-EDTA (1X pH 7,5)] foram colocados em tubos 2 μ L contendo 0,4 μ L de Tampão 10X 1,1 μ L de Labeling Spike-In e 0,5 μ L de Calf Intestinal Phosphatase. Para esta reação de desfosforilação os tubos foram mantidos a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de desnaturação pela adição de 2,8 μ L de dimetilssulfóxido (DMSO) 100% e aquecimento a 100°C por 10 minutos. Imediatamente após essa fase, as amostras foram colocadas no gelo para a manutenção do estado desnaturado. Após a fase de desnaturação, as amostras foram submetidas a uma fase de ligação pela adição de 4,5 μ L do Master Mix de ligação contendo T4 RNA Ligase. Essa mistura de reação é composta de 1 μ L de Tampão 10X, 3 μ L de Cianina 3-pCp e 0,5 μ L de T4 RNA Ligase. Essa reação foi incubada a 16°C por 2 horas. Após a secagem em concentrador à vácuo a 55°C (aproximadamente 3 horas), as amostras foram preparadas para a hibridação. Essas foram ressuspensas em 17 μ L de água livre de

nucleasse e foi adicionado 1,0 μ L da solução Hyb Spike-In (terceira diluição), 4,5 μ L de 10X GE Blocking Agent e 22,5 μ L de 2X Hi-RPM Hybridization Buffer num total de 45 μ L e incubadas a 100°C por 5 minutos e posteriormente em gelo por 5 minutos. Após breve centrifugação, 45 μ L de cada amostra foram dispensados no centro do gasket e as lâminas foram posicionadas para posterior hibridação em forno a 55°C por 20 horas a 20 rpm. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas e escaneadas. A lavagem consistiu em banhos consecutivos em soluções de Wash Buffer 1 por 5 min e Wash Buffer 2 por 5 min a 37°C. A captura das imagens foi realizada no Microarray Scanner System (Agilent Technologies), utilizando-se o Scan Control Software 9.X. A extração e a normalização dos dados foram realizadas utilizando-se o Software Feature Extraction v10.7.3 (Agilent Technologies). Os dados extraídos foram analisados pelo software BRB array tools e os gráficos foram gerados pelo software GeneSpring GX (Agilent Technologies).

4.6 ANÁLISES

4.6.1 Métodos de Análise da Expressão Global microRNAs

Para os experimentos de microarray de miRNA foram utilizadas cinco amostras de controles normal (tuba uterina) 25 tumores ovarianos primários (repetições de técnicas foram incluídas para quatro casos) e 10 tumores metastáticos. Realizou-se análise de cluster hierárquica utilizando-se menos uma correlação e ligação completa. Os grupos foram comparados através do teste t de duas amostras, estabelecendo-se um P-valor bicaudal de $0.05 <$ com uma baixa taxa de FDR $< 20\%$

(False Discovery Rate) e com valores de “Fold-change” (FC) alterados pelo menos duas vezes ($FC > 2$).

4.6.2 Comparações Analisadas

As comparações realizadas dentre os diferentes grupos foram:

- 1- Normal x Tumor
- 2- Tumor Primário x Metástase
- 3- Tumor Primário
 - a. Recidivado e não recidivado em 6 meses após a quimioterapia
 - b. Recidivado e não recidivado em 1 ano após a quimioterapia
 - c. Recidivado e não recidivado em 2 anos após a quimioterapia

4.6.3 Previsão do Alvo do microRNA

Os alvos putativos dos miRNAs foram previstos usando-se miRWalk 2.0 (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/custom.html>), em quatro diferentes algoritmos (miRWalk, RNA22, miRanda e Targetscan).

As interações miRNA/mRNA validadas experimentalmente foram encontradas no banco de dados miRTarBase (CHOU et al. 2016) (validação com experimentos que utilizaram o ensaio de gene repórter).

A análise integrativa foi proveniente de 415 pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau do banco de dados do TCGA microRNA (Illumina HiSeq v2) (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>). Os resultados de análise integrativa foram definidos por interações mostrando correlações negativas significativas após correção de Bonferroni.

4.6.4 Análise de Vias *in Silico*

Os softwares de análise de vias Ingenuity Pathway Analysis (IPA v8.0, Ingenuity Systems) e KOBAS (v 3.0; <http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) foram usados para identificar as vias canônicas relacionados com as moléculas identificadas na análise integrativa.

4.6.5 Associação entre a Expressão de MIRNAS e Resposta ao Tratamento e Prognóstico

Para identificar um marcador capaz de prever a resposta à quimioterapia, foi utilizado o método de análise (DLDA) de diagonal linear discriminante e validação cruzada *leave-one-out* (LOOCV), usando-se ferramentas de matriz BRB v. 4.4.0. Foi comparado grupos de pacientes com recidiva em menos de um ano, a partir do último ciclo de quimioterapia, com casos recidivados após este período. A comparação entre pacientes que recidivaram e não recidivaram em 2 anos também foi feita.

Para a análise de sobrevida, a expressão de microRNA foi dicotomizada (acima e abaixo da mediana) a fim de testar a sua associação com sobrevida global e livre de doença pelo teste de classificação log e método de Kaplan-Meier. Análises estatísticas foram realizadas com SPSS (v. 21,0; SPSS, Chicago, IL, EUA) e P bicaudal $<$ valor 0,05 foi considerado significativo.

4.7 VALIDAÇÃO DE ESTUDO TRANSVERSAL

Para validar a nossa lista de dados de miRNA e seus genes-alvo foi realizada uma análise de estudo transversal de validação. Esta abordagem foi mostrada para

aumentar a reprodutibilidade dos resultados de plataforma de grande escala. Os dados externos das amostras de câncer de ovário foram rastreados (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>, acesso em dezembro de 2016) usando-se uma base de dados pública (TCGA). Foi aplicado o Teste *T-Student* para a comparação entre pacientes que morreram em até 6 meses após o diagnóstico, pacientes provavelmente resistentes à quimioterapia e pacientes que não morreram (valor $P < 0,05$). O teste de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a sobrevivência global e livre de doença e utilizou-se análise de regressão de Cox multivariada (P valor $< 0,05$).

4.8 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares de câncer de ovário (A2780, A2780-CP20, HEYA8, HEYA8-MDR, SKOV3, SKOV3 - TR), a linhagem de célula epitelial normal de ovário (HIO180) e a linhagem de monócito humano THP1 foram mantidas com meio RPMI suplementado com 10% FBS e 100 UI/mL penicilina-estreptomicina. A linhagem resistente a múltiplas drogas, HeyA8-MDR e resistente ao taxol SKOV3-TR foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina com paclitaxel adicionado (300 ng/mL 150 ng/mL respectivamente) (KANLIKILICER et al. 2016). A linhagem de célula de câncer de ovário resistente à platina A2780-CP20 foi desenvolvida e mantida como descrito anteriormente (MORENO-SMITH et al. 2013). Todas as linhagens celulares foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Gabriel Lopez-Berestein, MD Anderson, e todas foram autenticadas através do *Core Facility* (da Universidade do Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). A característica das células utilizadas neste trabalho

forma resumidas no Quadro 1. Para a polarização de THP1 em M0, THP-1 foi tratada com 10 ng/ml de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (PMA) por 24 h.

Quadro 1 - Características das linhagens celulares.

Célula	Morfologia	Histologia	Sensibilidade a quimioterapia
HIO-180	Epitelial	Células imortalizadas	-
A2780	Epitelial	Adenocarcinoma	Sensível
A2780-CP20	Epitelial	Adenocarcinoma	Resistente a Platina
HEYA8	Epitelial	Adenocarcinoma	Sensível
HEYA8-MDR	Epitelial	Adenocarcinoma	Resistente a Paclitaxel (Taxol)
SKOV3	Epitelial	Células-Claras	Sensível
SKOV3-TR	Epitelial	Células-Claras	Resistente a Paclitaxel (Taxol)
THP1	Monócito	Leucemia Aguda Monocítica	-

4.9 WESTERN BLOTTING

Os lisados celulares foram centrifugados e os sobrenadantes foram coletados para a dosagem da concentração proteica utilizando o ensaio da proteína BCA (Pierce, Waltham, MA). As amostras proteicas foram submetidas a electroforese em gel de poliacrilamida (Bio-Rad, Hércules, CA) e então transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (Bio-Rad). Membranas foram bloqueadas, lavadas e incubadas com anticorpos primários contra P-Glycoprotein Antibody (1:100 ab p7965), β -catenina (1:1000 ab9562) e Beta-actina (1:2000) após incubação overnight a 4° C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As bandas de proteínas foram detectadas com o kit de detecção de quimioluminescência reforçada (GE Healthcare, Piscataway, NJ). β -actina foi usada como o controle.

4.10 EXTRAÇÃO DE EXOSSOMOS DE MEIOS DE CULTURA CELULAR

A célula THP1 foi tratada com meio pobre em FBS por 36h. O meio da célula foi centrifugado a 2.000 g durante 10 min e em seguida os resíduos celulares foram removidos. O sobrenadante foi filtrado através de membrana de 200nm e ultracentrifugado em 100.000g por 2horas, 4oC. O pellet foi lavado com PBS e ultracentrifugado novamente por 100.000g 2horas, 4oC. Para a extração do RNA, foi adicionado trizol ao pellet de exossomos e procedeu-se ao isolamento de RNA. Para o tratamento de HEYA8 com exossomos de THP1, o isolamento dos exossomos se deu da mesma forma mencionada acima e o meio RPMI foi adicionado ao exossomo isolado e em seguida foi filtrado.

4.11 CO-CULTURA

Com o objetivo de mimetizar a interação entre o câncer de ovário com o microambiente tumoral, foi realizada a co-cultura entre células de câncer de ovário, SKOV3, com THP1. Foram plaqueadas 1×10^6 células de THP-1 no inserto superior do transwell de membrana com o poro de 0,4 μm (Corning, Lowell, MA, EUA) e 5×10^5 células de SKOV3 por 24 horas. O controle negativo, o SKOV3 foi plaqueado com 1×10^6 SKOV3 célula na parte superior do transwell (WANG et al. 2013). Após 24 horas de co-cultivo, o RNA das células foi coletado.

4.12 TRANSFECCÃO COM ANTAGOMIR

Foi plaqueado 5×10^5 células da linhagem HEYA8 em cada poço de uma placa de 6 poços. A célula foi transfectada com 100 pmol de antagomiR dos miRNAs miR-143 (mirVana® miRNA inhibitor, Assay ID MH10883) e miR-934 (mirVana® miRNA inhibitor, Assay ID AM12529), e controle negativo (mirVana™ miRNA Inhibitor Negative).

Os antagomiRs e o controle foram diluídos em 50 μ L de Opti-MEM. Em seguida 10 μ L de Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) foi diluída em 50 μ L de Opti-MEM. As diluições do antagomiR e do agente de transfecção foram misturadas e incubadas por 25 minutos em temperatura ambiente. A seguir 100 μ L do complexo mais 2 ml de Opti-MEM foram adicionados em cada poço.

As células foram incubadas a 37^0 em incubadora de CO₂ e após 4 horas da transfecção o meio foi trocado pelo meio convencional. As células foram removidas da placa com tripsina/EDTA após 24 horas e armazenadas a -80^0 para em seguida a extração do RNA total.

4.13 EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISES DE EXPRESSÃO

A extração de RNA de todos os ensaios celulares foi realizada com o kit Zymo Research Mini RNA Isolation de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão de miRNA foi medida pelo método de qRT-PCR TaqMan miRNA (Applied Biosystems). 10 ng de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA com o uso do kit de transcrição reversa de miRNA (Applied Biosystems) de

acordo com o protocolo do fabricante. Todas as reações de PCR em tempo real foram executadas em triplicado. A expressão de cada miRNA foi normalizada em relação a pelo menos dois controles endógenos (RNU48, RNU44, U6) pelo método de $2^{-\Delta Ct}$. Para analisar a expressão gênica, o DNA complementar total (cDNAs) foi transcrito utilizando o kit SuperScript III cDNA kit (Invitrogen) com random primer. O PCR em Tempo Real foi realizado por SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e primers específicos de cada gene (Quadro 2). Toda reação de expressão genica foi normalizada com pelo menos dois controles internos (GAPDH, U6, HPRT1) pelo método de $2^{-\Delta Ct}$.

Quadro 2 - Sequência de primers utilizados neste trabalho.

Primer	Sequencia 5'-3'
<i>FZD5_F</i>	5'-CTTGTTTCCAAAGTCCAATCAAGTG-3'
<i>FZD5_R</i>	5'- GCCTACTCTTCACCCTTCTTTAACG-3'
<i>FZD3_F</i>	5'-CATGGAGATGTTTGGTGTCCTT-3'
<i>FZD3_R</i>	5'-AAGTCGAGGATATGGCTCATCAC-3'
<i>CTNB1_F</i>	5'-CCCCTGGCCTCTGATAAAGG-3'
<i>CTNB1_R</i>	5'-ACGCAAAGGTGCATGATTTG-3'

4.14 *IN SITU HIBRIDIZATION*

A técnica de The ISH foi realizada nas amostras de microarranjo tecidual (tissue microarray- TMA) de amostras com câncer de ovário proveniente do departamento de patologia do A.C.Camargo Cancer Center em colaboração com a Dra. Xinna Zhang do departamento de RNA Interference and Non- coding RNAs, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. A hibridação *in situ* é usada para revelar a localização do miRNA, as sondas de ácido

nucleico marcadas com digoxigenina dupla (LNA, Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) foram hibridizados por 3 h a 55° C. A detecção foi realizada com fragmento Fab fosfato alcalino anti-DIG seguido por cloreto de tetrazólio nitro azul / desenvolvimento de cor de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/ BCIP) (Ventana, Roche, Basileia, CH) (FUENTES-MATTEI et al. 2017). A porcentagem de células marcadas variou de 0 a 100% e a intensidade de marcação variou entre 0 (ausência de marcação) 1 (marcação fraca) 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte), podendo-se classificar o HScore de 0 a 300.

4.15 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica foi realizada de forma automatizada (Ventana BenchMark AutoStainer) com anticorpo policlonal anti-humano FZD3 (1: 250 ab-75233). Os anticorpos foram incubados a 37 ° C durante 32 min. A coloração específica foi detectada aplicando-se anticorpo secundário dirigido contra as espécies de anticorpo primário e uma enzima com um substrato substrato-cromogênio (peroxidase de rábano - HRP). O complexo foi então visualizado com substrato de peróxido de hidrogênio e cromogênio de tetrahidrocloreto de 3, 3'-diaminobenzidina (DAB). Como controle positivo foi utilizado o tecido de câncer de colorretal, uma vez que o aumento da expressão de FZD3 já foi estabelecido. A análise do TMA foi realizada com a ajuda de uma ginecopatologista (LB). Os níveis de expressão proteica foram representados pela porcentagem de células positivas e a intensidade de marcação, seguindo a fórmula $HScore = \Sigma$ (porcentagem de células positivas x intensidade de marcação). A porcentagem de células marcadas variou de 0 a 100% e

a intensidade de marcação variou entre 0 (ausência de marcação) 1 (marcação fraca) 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte), podendo-se classificar o HScore de 0 a 300.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi usado o programa *Statistical Package for the Social Sciences-SPSS*, para Windows, versão 22.0, o programa R, versão 3.2.4. e o programa *GraphPad Prism*, versão 6.0. Para a comparação de dois grupos foi usado o teste t de Student, já para comparações múltiplas foi utilizado o teste ANOVA (Analysis of Variance).

As curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença foram feitas pelo método de Kaplan-Meier 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 et al. 1992).

Para todos os testes realizados, foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 RESUMO DOS RESULTADOS

Os principais resultados deste trabalho estão sumarizados na figura abaixo (Figura 5).

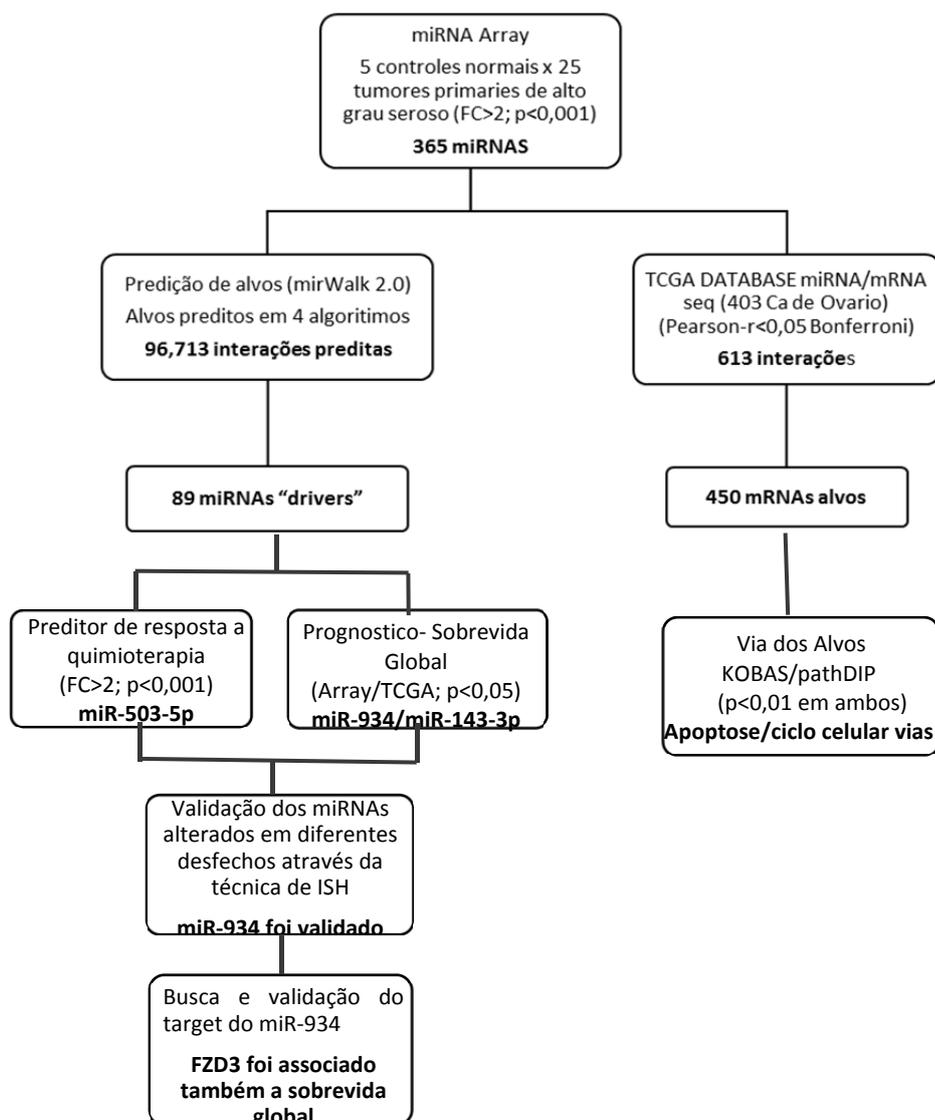


Figura 5 - Fluxograma dos principais resultados deste estudo.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

Das variáveis clínicas, a citorredução primária ótima (ausência de doença residual macroscópica) foi a que mais interferiu na sobrevida das 339 pacientes com tumor de ovário (Figura 6)

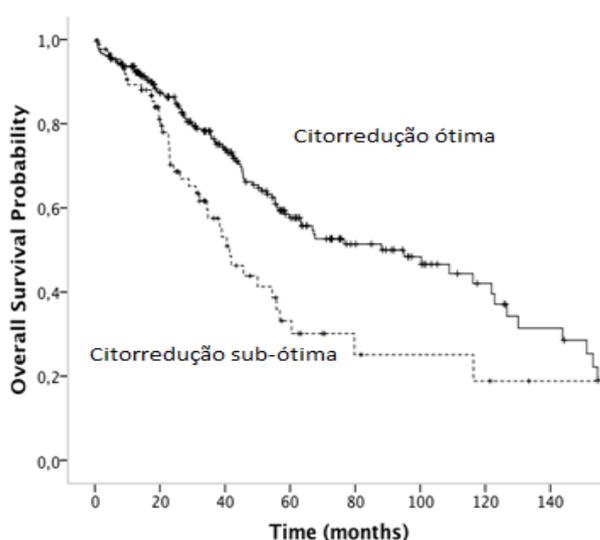


Figura 6 - Teste de distribuições de sobrevivência entre pacientes com citorredução ótima e citorredução sub-ótima.

Após a revisão dos dados anatomopatológicos, nós observamos a presença de NIT em 2 pacientes (Figura 7). Essa baixa frequência encontrada em nosso estudo pode ser devido ao estadiamento avançado das nossas amostras, dificultando assim a identificação de lesões precursoras. Apesar da baixa frequência, constatamos a presença destas lesões precursoras nos estadiamentos mais avançados, suportando assim a teoria do adenocarcinoma seroso de alto grau poder ter origem nas tubas de falópio.

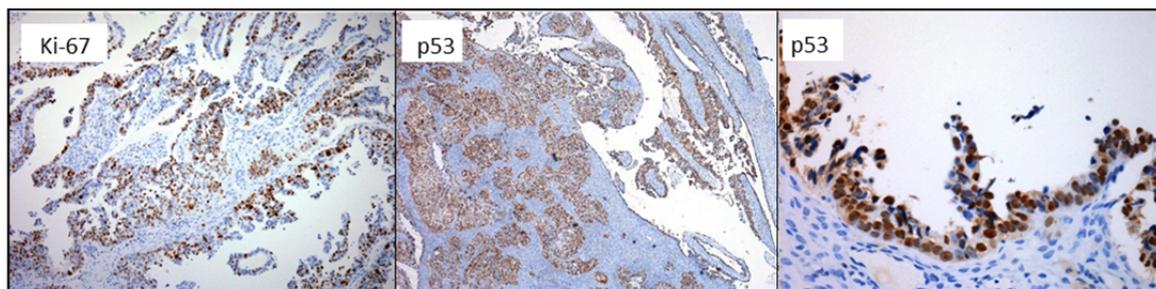


Figura 7 - Imuno-histoquímica positiva para P53 e Ki67 nas tubas de falópio com presença de NIT.

Dentre as pacientes selecionadas para o nosso estudo, de acordo com os critérios de inclusão, a média de idade foi de 54 anos e a maioria dos tumores primários apresentou presença de invasão vascular sanguínea, linfática e cápsula comprometida. O índice mitótico variou entre 0-60 em 10 campos. Além dos dados anatomopatológicos, observamos que existe grande variação das concentrações plasmáticas de CA-125 entre as pacientes antes e após a cirurgia (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínico patológicas das pacientes incluídas na expressão global de miRNAs deste estudo.

Variantes			N	%
Idade	Média	54		
	Varição	42-71		
Clínica	CA 125 Pré Cirurgia (U/mL)	Média	1.200	
		Varição	16-9.759	
	CA 125 Pós Cirurgia (U/mL)	Média	149	
		Varição	12-402	
Anatomopatológico	IVS	Presente	21	78
		Não Detectada	6	22
	IVL	Presente	16	59
		Não Detectada	11	41
	IP	Presente	1	4
		Não Detectada	26	96
	Cápsula Comprometida	Presente	21	78
		Não Detectada	6	22
IM/10 campos	0-20	7	26	
	20-40	12	44	
	40-60	8	30	

Legenda - *IVS- Invasão Vascular Sanguínea, IVL- Invasão Vascular Linfática, IP- Invasão Perineural, IM- Índice Mitótico.

5.3 QUALIDADE DO RNA

As concentrações de RNA Total variaram entre 70-1000 ng/ μ L e o *RNA Integrity Number* (RIN) foi de aproximadamente 2.4 entre as amostras (Figura 8). Apesar do baixo valor de RIN, ZHANG et al. (2008) demonstraram alta correlação entre a expressão de miRNAs entre amostras parafinadas e a fresco, independentemente da baixa integridade do RNA total em amostras parafinadas devido a estabilidade e tamanho (20-22nt) dos miRNAs.

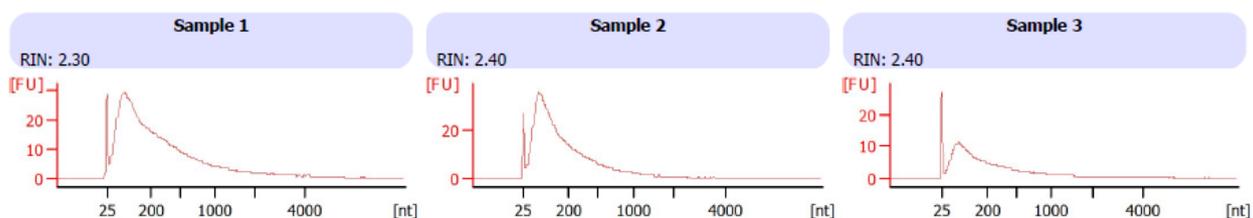


Figura 8 - Valores de RIN do RNA total.

5.4 DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS

5.4.1 Perfil de Expressão de miRNAs em Câncer de Ovário

O “*Principal Componente Analysis*” (PCA) mostrou que o perfil de expressão de miRNAs foi distinto entre as amostras tumorais e amostras de controle normal (tuba de Falópio). Observamos que as amostras de metástase apresentaram um perfil semelhante aos tumores primários. As réplicas técnicas tiveram um padrão semelhante, demonstrando a reprodutibilidade do perfil de expressão dos miRNAs (Figura 9A). A análise não supervisionada revelou dois distintos clusters de tumor

primário que não foram associados com o risco de progressão da doença ou morte por câncer (Figura 9B).

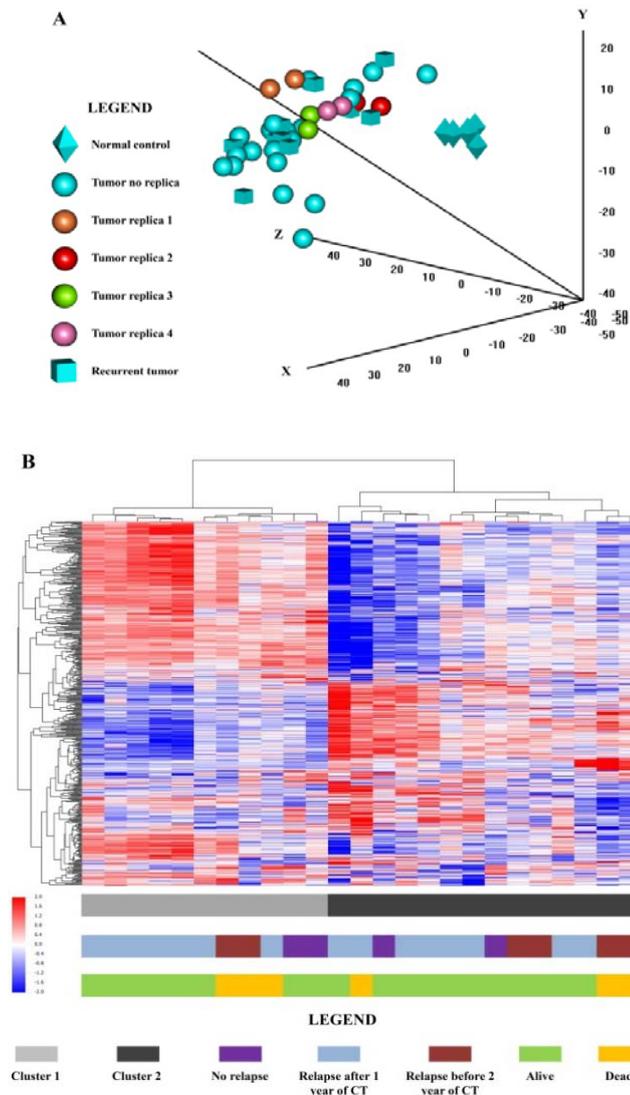


Figura 9 - PCA entre as amostras normais x amostras tumorais x amostras metastáticas (A). Análise de Cluster hierárquico não supervisionada (B).

5.4.2 Normal X Tumor

A comparação entre as 25 amostras de tumor primário contra 5 normais identificou 365 miRNAs diferencialmente expressos ($p < 0.001$, $FC > 2$, $FDR < 5\%$), em que 207 foram hiper-regulados e 158 foram hiporregulados no câncer de ovário (Apêndice 1 – Tabela S1).

5.4.3 Tumor Primário X Metástase

Observamos que o perfil de expressão entre as amostras de tumor primário e as amostras metastáticas foi bem semelhante. Entretanto, a expressão de microRNAs foi comparada entre amostras metastáticas após quimioterapia e os tumores primários correspondentes, com a intenção de encontrarmos marcadores associados a quimiorresistência e metástase. Foram avaliadas vinte amostras pareadas de 10 pacientes, revelando que o hsa-miR-150-5p ($P = 0,025$, $FDR = 45\%$, $FC = 2,9$) (Figura 10).

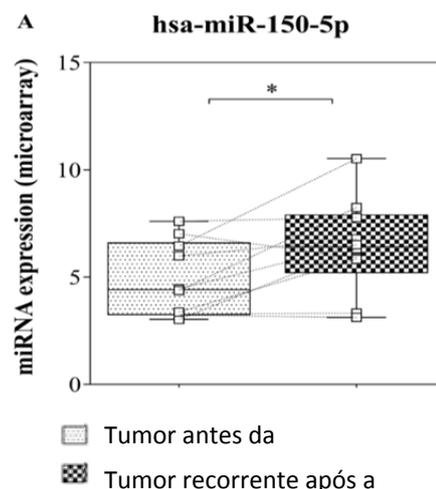


Figura 10 - O hsa-miR-150-5p apresentou aumento de expressão em tumores recorrentes. As linhas pontilhadas indicam a correspondência entre as amostras pareadas.

5.4.4 Diferentes Desfechos Clínicos

Para que pudéssemos identificar miRNAs capazes de auxiliar na predição à resposta quimioterápica e no prognóstico de pacientes com o mesmo perfil clínico, realizamos as seguintes análises - microRNAs Diferencialmente Expressos entre Pacientes Recidivadas e não Recidivadas em 6 Meses após a Quimioterapia e microRNAs Diferencialmente Expressos entre Pacientes Recidivadas de acordo com o Intervalo Livre de Platina.

5.4.4.1 microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes recidivadas e não recidivadas em 6 meses após a Quimioterapia

Pacientes que recidivam em até 6 meses após o término da quimioterapia são consideradas resistentes à quimioterapia. Observamos que pacientes recidivadas apresentaram aumento da expressão dos miRNAs, hsa-miR-503-3p ($p= 0,001$, FC= 5) e o hsa-miR-760 ($p= 0,035$, FC= 1,5).

5.4.4.2 microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes recidivadas de acordo com o intervalo livre de Platina

Já se sabe que o intervalo livre de platina é considerado um fator preditivo para pacientes com câncer de ovário recidivadas (FOLEY et al. 2013) (Tabela 2). Sabendo-se disso, buscamos analisar miRNAs diferencialmente expressos e observamos que o hsa-miR-503-5p aumentou progressivamente de forma significativa em pacientes com menor tempo de recidiva após o término da quimioterapia. A expressão aumentada de hsa-miR-503-5p foi encontrada em tumores não-responsivos, pacientes recidivados em menos de um ano, ($p= 1 \times 10^{-5}$,

FDR = 0,009) comparado às pacientes não recidivadas em um ano após o término da quimioterapia. Este marcador apresentou 100% de sensibilidade e 89,5% de especificidade (AUC = 0.965, CI = 1.000-0.899) em prever a recaída em menos de um ano após o último ciclo de quimioterapia (Figura 11).

Tabela 2 - Intervalo livre de platina como fator preditivo.

Intervalo Livre de Platina (meses)	Taxa de Resposta	Resposta Patológica Completa
5-12	27%	5%
13-24	33%	11%
>24	59%	22%

Fonte: FOLEY et al. (2013)

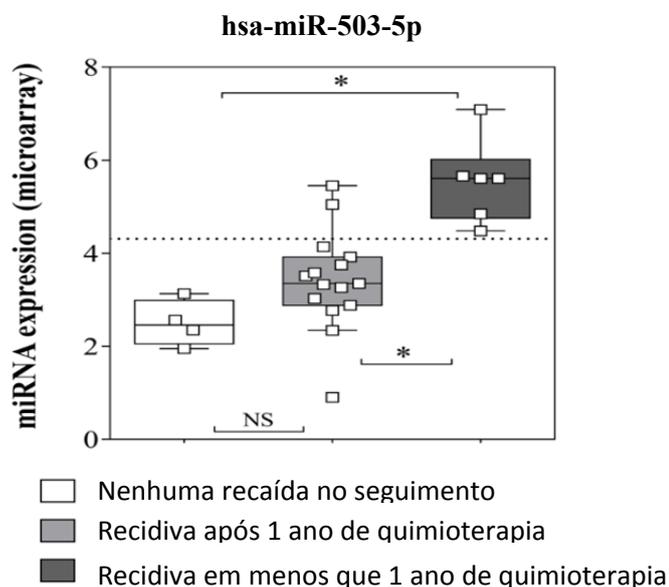


Figura 11 - O miRNA hsa-miR-503-5-p como preditor de resposta de quimioterapia. A linha pontilhada representa o limiar otimizado para obter a melhor precisão.

5.4.4.3 microRNAs e Sobrevida Global

Em relação a expressão dos miRNAs com o prognóstico, casos com baixa expressão de hsa-miR-29a-5p ($P=0.007$) e hsa-miR-663a ($P=0.047$) e alta expressão de hsa-miR-23a-3p ($P=0.033$), hsa-miR-143-3p ($P=0.044$), hsa-miR-455-3p ($P=0.044$) e hsa-miR-934 ($P=0.049$) foram associados a pior sobrevida global.

5.5 VALIDAÇÃO DOS miRNAs PELO BANCO DE DADOS DO “THE CANCER GENOME ATLAS” (TCGA)

5.5.1 Validação dos miRNAs associados com pior Sobrevida Global

Apenas a associação do aumento de hsa-miR-934 com pior sobrevida global foi validada em amostras do banco de dados do TCGA ($p= 0,0016$). Além da associação com a sobrevida global, o aumento da expressão do miRNA também foi associado a pior sobrevida livre de doença em pacientes com adenocarcinoma de ovário provenientes do banco de dados do TCGA ($p=0,00038$) (Figura 12). Considerando que a casuística do TCGA não apresentava todas as características clínicas da amostragem homogênea incluída neste estudo, podemos justificar a baixa taxa de validação dos miRNAs.

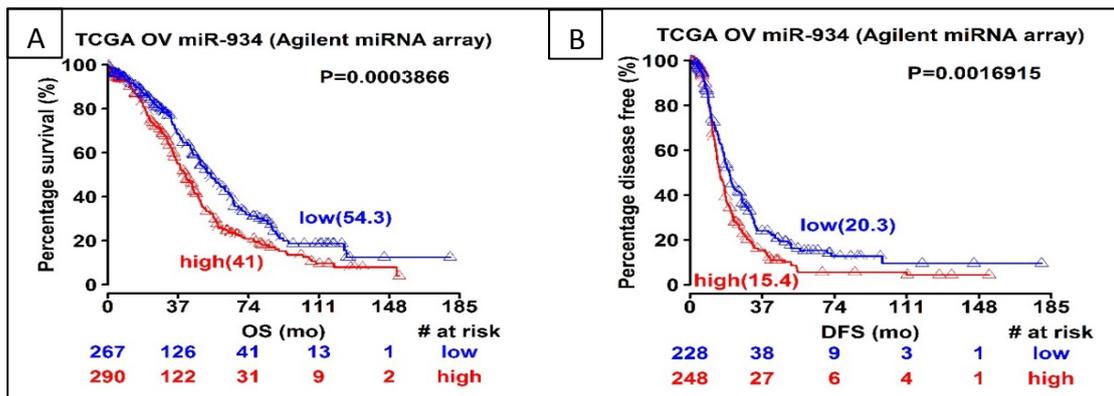


Figura 12 - Validação da associação entre a alta expressão de hsa-miR-934 e a pior sobrevida global. (A) e livre de doença (B) em pacientes com câncer de ovário provenientes do TCGA.

Além da associação do hsa-miR-934 com pior sobrevida global, observamos que o aumento da expressão do hsa-miR-143-3p foi encontrado no grupo de pacientes que morreram antes de 6 meses comparado ao grupo de pacientes que não morreram em 2 anos. Interessantemente, observamos este mesmo resultado em duas diferentes plataformas oferecidas pelo banco de dados do TCGA, plataforma da Agilent 8 × 15 Human miRNA array (p= 0,0061) e Illumina HiSeq (p= 0,0104) (Figura 13).

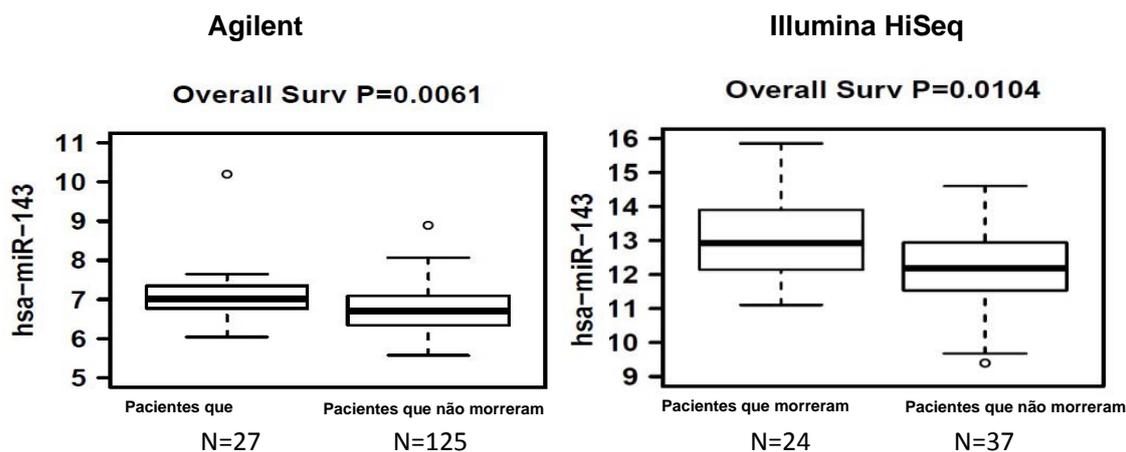


Figura 13 - Aumento da expressão do hsa-miR-143-3p em pacientes que morreram em até seis meses em comparação com pacientes que não morreram em até 2 anos após o diagnóstico em duas distintas plataformas provenientes do banco de dados do TCGA.

O banco de dados do TCGA não foi usado para confirmar nossos achados a respeito do hsa-miR-503-5p, uma vez que não se tem todas as informações a respeito do tratamento quimioterápico.

5.5.2 Comparação da Expressão do miRNAs MIR-934, Cluster-MIR-143-3P entre amostras Normais E Tumorais

Tendo em vista que o aumento dos miRNAs hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p foram associados ao pior prognóstico de pacientes com câncer de ovário, buscamos compreender o papel oncogênico destes miRNAs.

A comparação entre tecido normal - proveniente de tuba de Falópio - também foi realizada nas amostras do TCGA. Observamos que todos estes miRNAs apresentaram o mesmo perfil entre normal *versus* tumor no nosso estudo e nas amostras do TCGA. O hsa-miR-934 foi aumentado de forma significativa tanto no

tumor primário ($p=0,0003$) quanto em amostras de metástase ($p=0,0013$) nos casos internos do nosso estudo (Figura 14A). Este miRNA também teve um aumento de forma progressiva de acordo com o estadiamento das pacientes provenientes do TCGA ($p=0,0014$) (Figura 14B). Surpreendentemente, apesar do aumento do hsa-miR-143-3p ter sido associado ao pior prognóstico de pacientes com câncer de ovário, observamos que este miRNA, bem como os hsa-miR-145-3p e hsa-miR-145-5p (cluster), estavam significativamente diminuídos nos tumores em relação ao grupo normal em nosso estudo ($p<0,0001$) (Figura 14-C) e em amostras do banco de dados do TCGA (Figura 14-D).

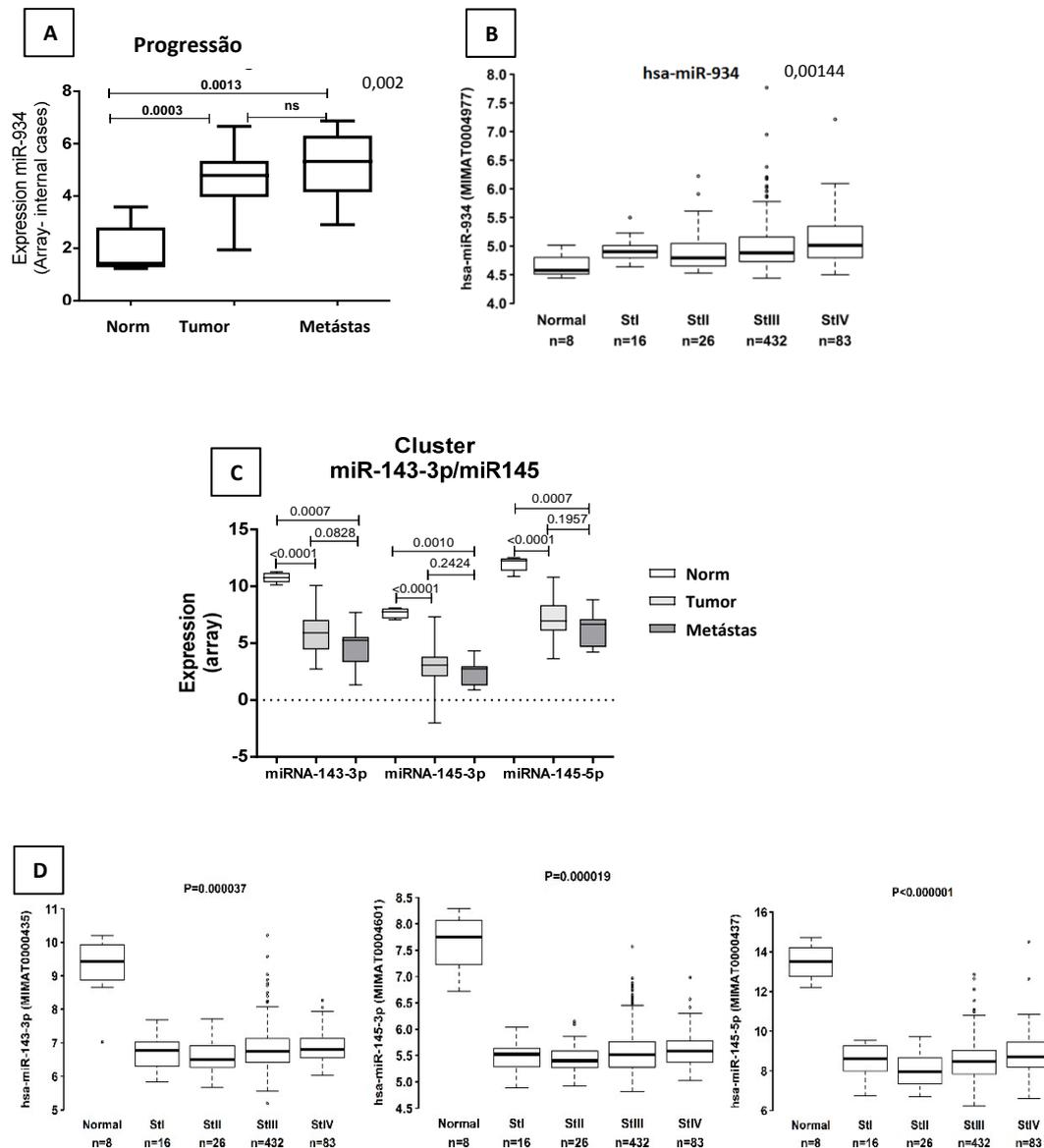


Figura 14 - Expressão do hsa-miR-934 e do cluster do miR-143/miR-145 no câncer de ovário. **A**-Aumento da expressão do hsa-miR-934 em tumores primários e metastáticos em relação ao controle normal na casuística interna **B**-Aumento progressivo da expressão do hsa-miR-934 em diferentes estadiamentos na casuística do TCGA. **C**-Diminuição da expressão do cluster do miR-143/miR-145 em tumores primários e metastáticos em relação ao controle normal na casuística interna. **D**-Diminuição da expressão do cluster do miR-143/miR-145 em amostra do banco de dados do TCGA.

5.6 LINHAGENS CELULARES DE OVÁRIO

A expressão da Glicoproteína-P, proteína associada a resistência a múltiplas drogas (MDR), foi avaliada através do Western Blot para a confirmação da resistência ao paclitaxel das linhagens HEYA8-MDR e SKOV3-TR, observamos que ambas as linhagens se mantiveram resistentes a quimioterapia (Figura 15)

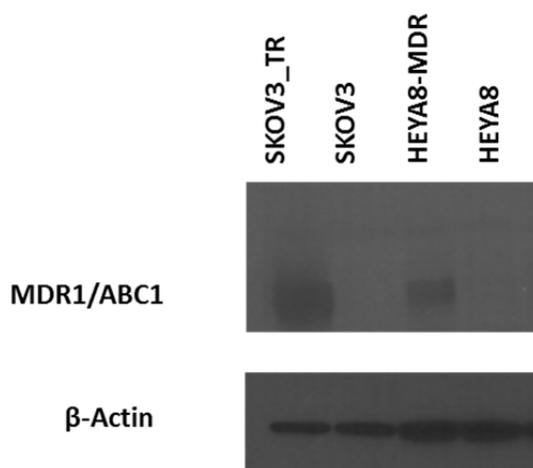


Figura 15 - Expressão da Glicoproteína-P (MDR1) apenas nas linhagens resistentes ao paclitaxel, SKOV3-TR e HEYA8-MDR.

5.7 EXPRESSÃO DE miRNAS EM LINHAGENS CELULARES DE OVÁRIO

5.7.1 Expressão dos miRNAs associados a pior sobrevida global, MIR-934 e MIR-143-3P

Assim como esperado, observamos uma hiper-regulação do hsa-miR-934 em linhagens tumorais em relação a linhagem de ovário epitelial (HIO-180) ($p=0,0166$). Este aumento foi considerado significativo apenas ao comparar as linhagens A2780/A2780-CP20 ($p= 0,05$) e HEYA8/HEYA8-MDR ($p=0,05$). As linhagens SKOV3/SKOV3-TR não apresentaram diferença de expressão com relação a célula normal ($p= 0,6286$) (Figura 16-A).

Assim como nas amostras tumorais deste estudo e do banco de dados do TCGA, a expressão do hsa-miR-143-3p também foi encontrada de forma significativamente reduzida em todas as linhagens tumorais em relação à linhagem normal (HIO-180) ($p<0,0001$) (Figura 16-B).

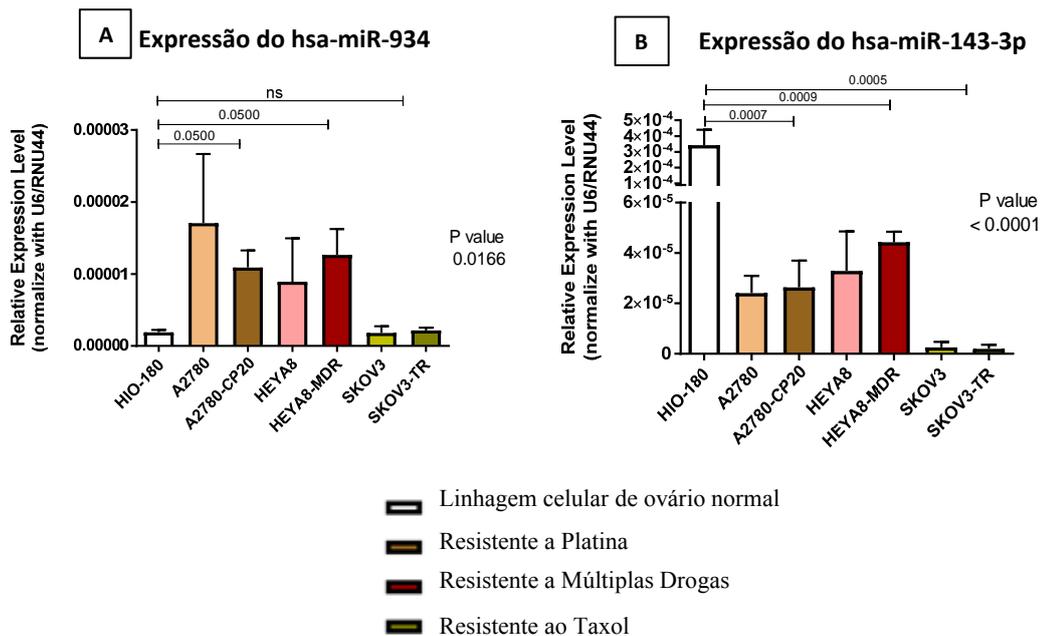


Figura 16 - Expressão do hsa-miR-934 e hsa-miR-123-3p em células normais e tumorais de ovário. A- Aumento de expressão do hsa-miR-934 entre as células tumorais em relação a linhagem normal de ovário (HIO-180), exceto a linhagem SKOV3 apresentou hiperexpressão. Nenhum par entre células sensíveis e resistentes a quimioterapia apresentou diferença de expressão deste miRNA. B- Diminuição da expressão do hsa-miR-143-3p entre as células tumorais em relação a HIO-180. Nenhum par entre células sensíveis e resistentes a quimioterapia apresentou diferença de expressão do miR-143-3p.

5.7.2 Expressão do MIR-503-5P Associado a Quimiorresistência

Buscando compreender o papel do hsa-miR-503-5p na quimiorresistência do câncer de ovário, avaliamos a expressão deste miRNA nas linhagens tumorais sensíveis (A2780, HEYA8, SKOV3), resistente à platina (A2780), resistente a múltiplas drogas (HEYA-MDR) e resistente ao taxol (SKOV3-TR).

Observamos que a expressão do hsa-miR-503-5p estava hiporregulada na maioria das linhagens tumorais ($p < 0,0001$) exceto na célula HEYA8 que apresentou aumento de expressão do hsa-miR-503-5p em relação a linhagem normal ($p = 0,0011$). Além disso observamos que seu par resistente a múltiplas drogas, HEYA8-

MDR. apresentou uma redução de hsa-miR-503-5p de forma significativa ($p=0,0011$) (Figura 17).

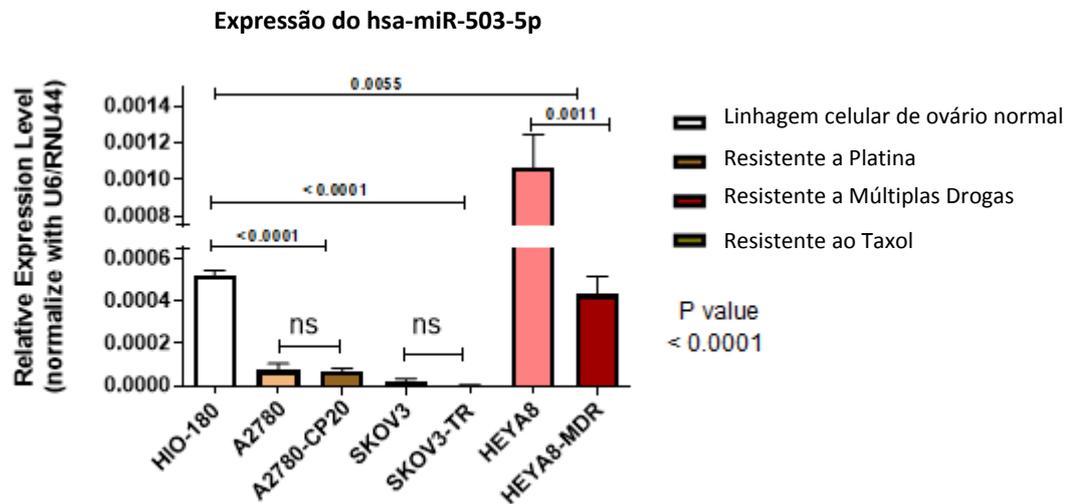


Figura 17 - Expressão do hsa-miR-503-5p em células normais e tumorais de ovário. O hsa-miR-503-5p apresentou diminuição da expressão na maioria das linhagens tumorais e diminuição na célula resistente a múltiplas drogas (HEYA8-MDR) em relação ao seu par sensível (HEYA8).

5.7.3 Expressão do MIR-143-3P em THP1

Tendo em vista que o aumento da expressão do hsa-miR-143-3p foi associado ao pior prognóstico das pacientes - apesar de estar hiporregulado nos tumores em relação aos controles normais - nós hipotetizamos que este miRNA era proveniente do microambiente tumoral. Para tal constatação, buscamos avaliar a expressão deste miRNA nas células de monócito humano THP1 e em sua célula diferenciada em macrófago (M0). Observamos que ambas as células THP1 e M0 apresentaram um aumento significativo da expressão do miR-143-3p em relação a todas as linhagens de ovário ($p<0,0001$) (Figura 18).

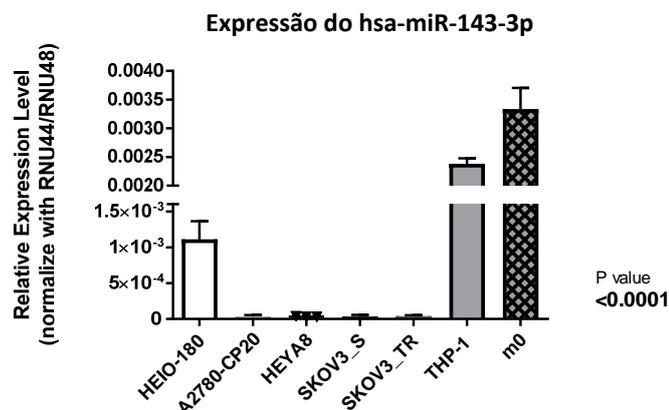


Figura 18 - Expressão do hsa-miR-143-3p em células normais e tumorais de ovário, em monócito e macrófago. Aumento da expressão do hsa-miR-143-3p em monócito (THP1) e em sua diferenciação em macrófago (M0) em relação a todas as linhagens de ovário.

5.7.4 Expressão do MIR-143-3P em Exosomo de THP1

Além do aumento da expressão do hsa-miR-143-3p em células de monócito e sua diferenciação em macrófago 0 em relação as células de ovário, observamos também que este miRNA estava presente em exossomos de THP1 (Figura 19), sugerindo, assim, que este miRNA talvez pudesse ser transferido do microambiente tumoral, principalmente do infiltrado inflamatório, para as células tumorais.

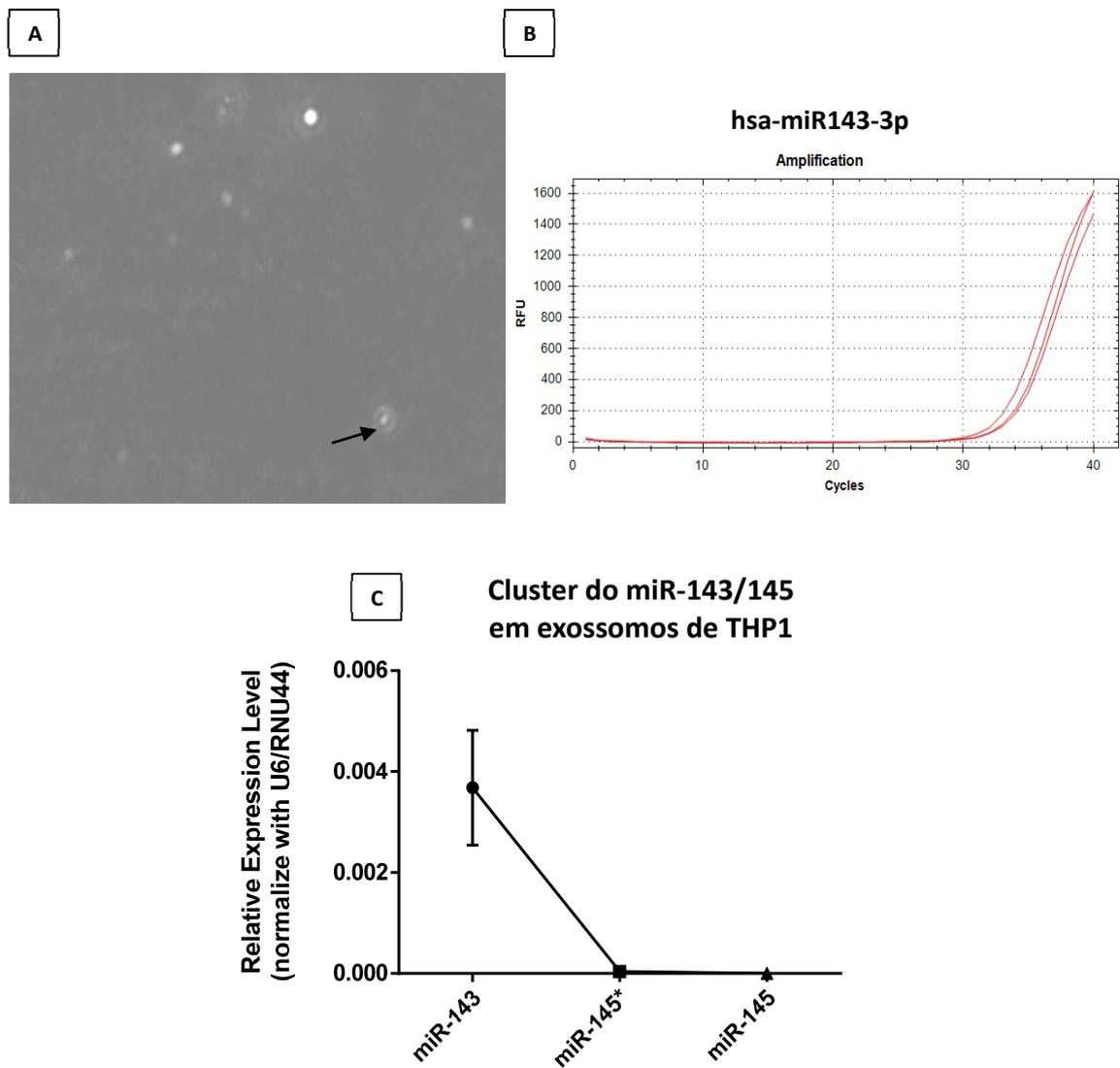


Figura 19 - Expressão do cluster miR143/miR145 em exossomos de THP1. A- Exossomos de THP, indicado pela seta B- Amplificação do hsa-miR-143-3p em exossomos de THP1. C- Comparação da expressão do cluster miR143/miR145 em exossomos de THP1.

5.7.5 Transferência do MIR-143-3P Através de THP1

Com o objetivo de identificar se a expressão do hsa-miR-143-3p pode ser alterada por células do infiltrado inflamatório, nós tratamos a célula HEYA8 com exossomos provenientes de THP1. Contudo, não houve alteração da expressão do miRNA em células tratadas em comparação com células não tratadas (Figura 20A). Para avaliar se outros fatores tais como citocinas provenientes de THP1 poderiam alterar a expressão do hsa-miR-143-3p nas células tumorais de ovário, além do tratamento das células com o exossomo de THP1, também foi realizado o co-cultivo entre células SKOV3, que apresentava a menor expressão do hsa-miR-143-3p dentre as células tumorais, e THP1. O co-cultivo entre SKOV3 e THP1 também não foi suficiente para aumentar a expressão do miR-143-3p na célula tumoral SKOV3 (Figura 20B).

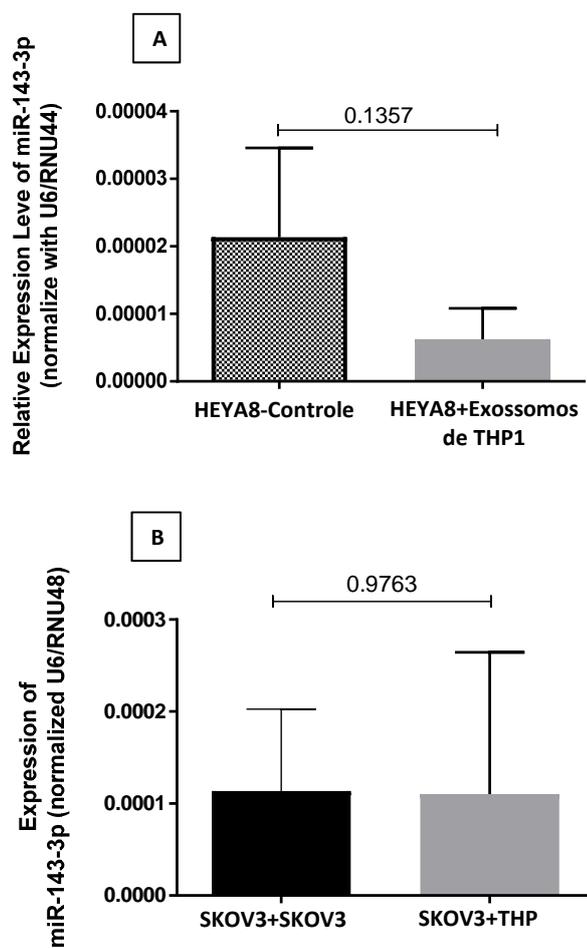


Figura 20 - Expressão de hsa-miR-143-3p em células HEYA8 tratadas com exossomos de THP1 e em co-cultura de células SKOV3 e THP1. A-Célula HEYA8 tratada com exossomos de THP1, B-Co-cultura entre SKOV3 e THP1 (24 horas).

5.8 VALIDAÇÃO DOS miRNAS PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* DE miRNA (ISH)

Com o objetivo de validar os nossos achados sobre os miRNAs associados à sobrevida, miR-934 e miR-143-3p, e associado a quimiorresistência, miR-503-5p, a técnica de ISH foi realizada. Escolhemos a técnica de ISH para a validação pois, além da expressão, é possível também avaliar a localização do miRNA.

A expressão dos miRNAs hsa-miR-143-3p, hsa-miR-934, foi associada ao tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida global (Apêndice 2 -Tabela S2).

Observamos pela técnica de ISH que ambos os miRNAs, hsa-miR-143-3p e hsa-miR-934, estavam expressos em células tumorais, fibroblastos e células do infiltrado inflamatório. Na marcação do hsa-miR-143-3p, observamos que 12% dos tumores apresentaram forte marcação do miRNA no infiltrado inflamatório, contudo estes pacientes não foram associados a pior sobrevida global ($p=0,392$) e nem sobrevida livre de doença ($p=0,313$).

Dentre os miRNAs selecionados para a validação por ISH, hsa-miR-934, miR- hsa-143-3p e hsa-miR-503-5p, apenas o hsa-miR-934 foi validado. Como esperado, o hsa-miR-934 apresentou um aumento de forma significativa nas amostras tumorais em relação aos controles normais, epitélio de tuba e epitélio de ovário normal ($P<0,0001$) (Figura 21A). Além disso, o aumento da expressão de hsa-miR-934 foi associado ao pior prognóstico de pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau ($P=0,025$) (Figura 21B). O ponto de corte para dicotomizar dois grupos foi baseado na mediana do HScore dentre as amostras 200.

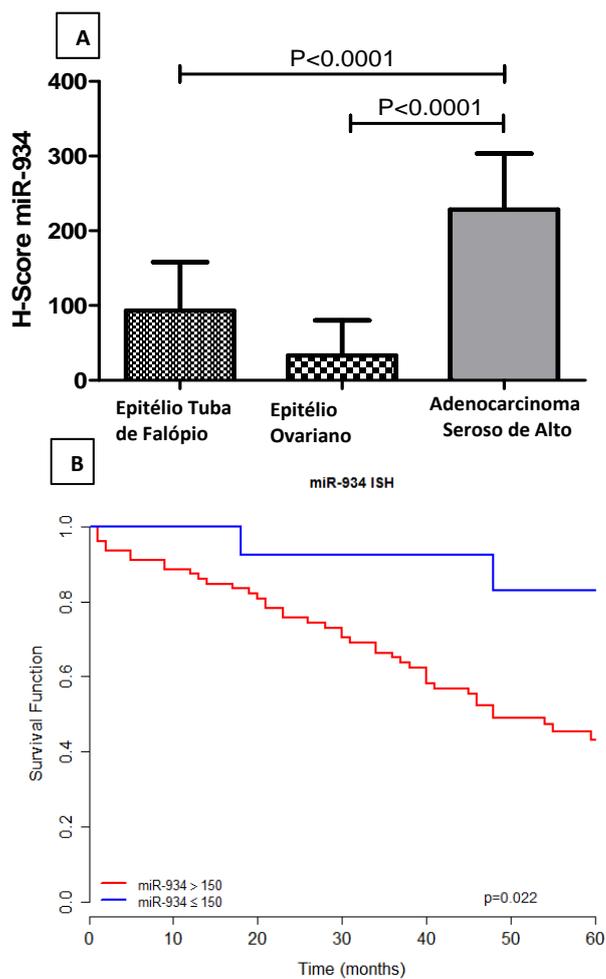


Figura 21 - Expressão do hsa-miR-934 no câncer de ovário e no tecido normal, e impacto da expressão do hsa-miR-934 na sobrevida global das pacientes com câncer de ovário. A- Compara o da expressão do miR-934 entre controles normais, epitélio de tuba de Falópio e de ovário e amostras de adenocarcinoma seroso de alto Grau. B- Curva de Kaplan Meier Plot de sobrevida global em pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau avaliados pela expressão do hsa-miR-934.

Além das validações a respeito do hsa-miR-934, observamos que este miRNA foi expresso no tumor e também no microambiente tumoral, principalmente em fibroblastos e em infiltrado inflamatório (Figura 22). A correlação positiva da expressão do hsa-miR-934 entre células tumorais e fibroblastos foi vista de forma significativa entre as amostras de tumor primário (Spearman $r=0,438$; $p<0,001$) e metástase ($r=0,397$; $p<0,001$) (Tabela 3).

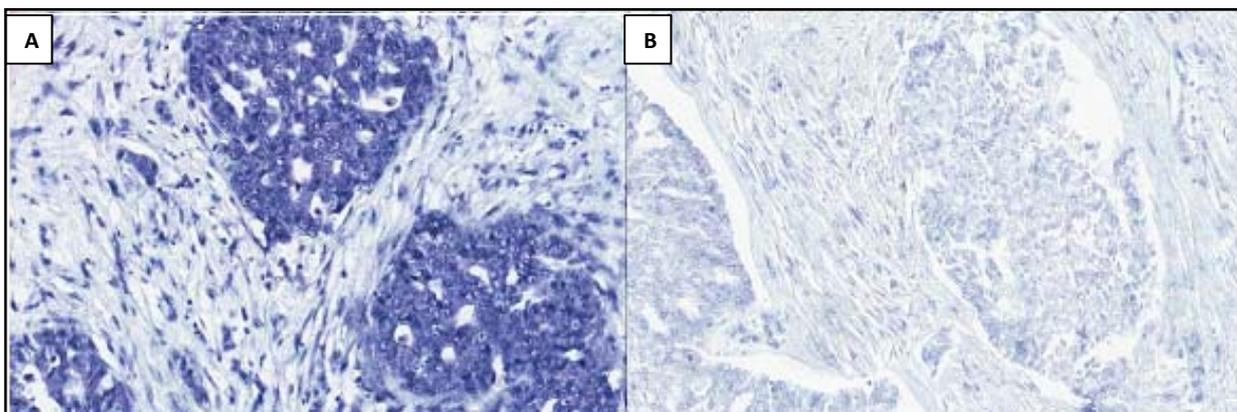


Figura 22 - Expressão do hsa-miR-934 em células tumorais e fibroblastos. A- Hiperexpressão do hsa-miR-934 em células tumorais e fibroblastos, B-Hipoexpressão do miR-934 em células tumorais e fibroblasto.

Tabela 3 - Correlação entre a expressão do hsa-miR-934 entre as células tumorais e fibroblasto do microambiente tumoral.

CORRELAÇÃO TUMOR PRIMÁRIO		
HScore miR-934 células tumorais e HScore hsa-miR-934 Fibroblastos		
Spearman's rho	Coefficiente de Correlação	,438
	Valor de P	,000
METÁSTASE		
HScore miR-934 células tumorais e HScore hsa-miR-934 Fibroblastos		
Spearman's rho	Coefficiente de Correlação	,397
	Valor de P	,000

Além do aumento da expressão do hsa-miR-934 ter sido validada pela técnica de ISH e associada a pior sobrevida global, foi observado também que as amostras metastáticas apresentaram maior expressão deste miRNA em relação as amostras de tumores primários ($p=0,0102$) (Figura 23). Com todas as evidências apresentadas neste trabalho, podemos sugerir que o miR-934 apresenta um papel de oncomiR em tumores de ovário.

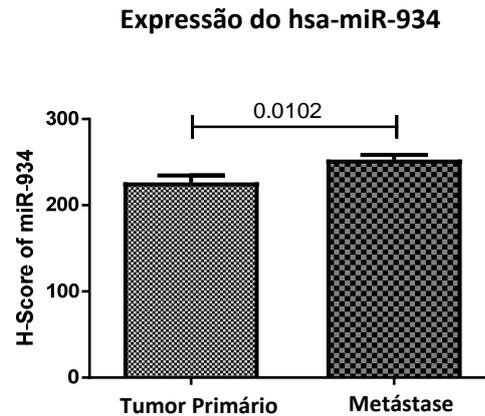


Figura 23 - Comparação da expressão do hsa-miR-934 entre tumores primários e metastáticos de ovário.

5.9 ALVOS DO MIR-934

Dentre os 303 genes preditos como alvo do hsa-miR-934, 6 apresentaram correlação negativa com o miRNA nas amostras do TCGA. Interessantemente 2 deles eram da mesma família, FZD3 e FZD5 (Tabela 4). Além disso, observou-se também que, além de hsa-miR-934, o hsa-miR-143 também tem como alvo o gene FZD3, que se tornou significativo para nós, porque ambos os miRNAs apresentaram associação com pior prognóstico. Quanto à função molecular, através dos *softwares* Genecodis e IPA, os genes alvos do hsa-miR-934 foram enriquecidos para as vias do ciclo celular, proliferação, transporte de transmembrana, diferenciação celular, sinal de transdução e transporte celular (Figura 24). Como esperado foi observada a presença de FZD3 com as vias de sinalização as associadas ao câncer e a via de Wnt/Beta-Catenina.

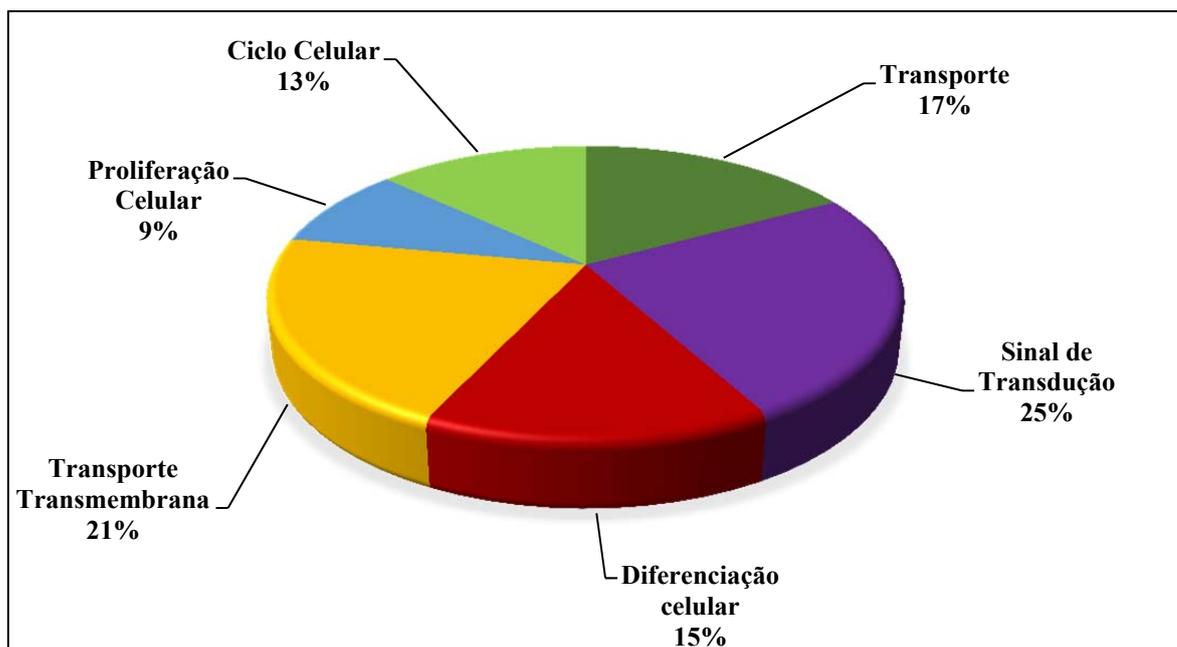


Figura 24 - Vias envolvidas em genes preditos como alvos do hsa-miR-934.

Tabela 4 - Alvos preditos do hsa-miR-934 negativamente correlacionados.

miRNA	Gene	Entrez ID	R	P
hsa-miR-934	SBK1	388228	-0.29	2.1E-09
hsa-miR-934	SLC35B4	84912	-0.24	9.9E-07
hsa-miR-934	FZD3	7976	-0.21	1.2E-05
hsa-miR-934	MSI2	124540	-0.21	2.5E-05
hsa-miR-934	FZD5	7855	-0.20	3.6E-05
hsa-miR-934	NOVA1	4857	-0.20	4.4E-05

Para determinar se os alvos negativamente correlacionados com o miR-934 estão associados com a sobrevida de pacientes com o câncer de ovário, utilizamos todas as plataformas existentes no banco de dados do TCGA (Agilent, Affymetrix-HT-HG-U133A, huex10, Affymetrix e análise de RNA-Seq-Illumina). Identificamos que 2 genes foram associados de forma independente com sobrevida livre (FZD5 e

SLC35B4) e 4 genes foram associados com a sobrevida global, (FZD3, FZD5, HMBS e SBK1) (Tabela 5).

O gene FZD5 foi associado a melhor sobrevida livre de doença em todas as plataformas e com sobrevida global em 3 plataformas (Figura 25).

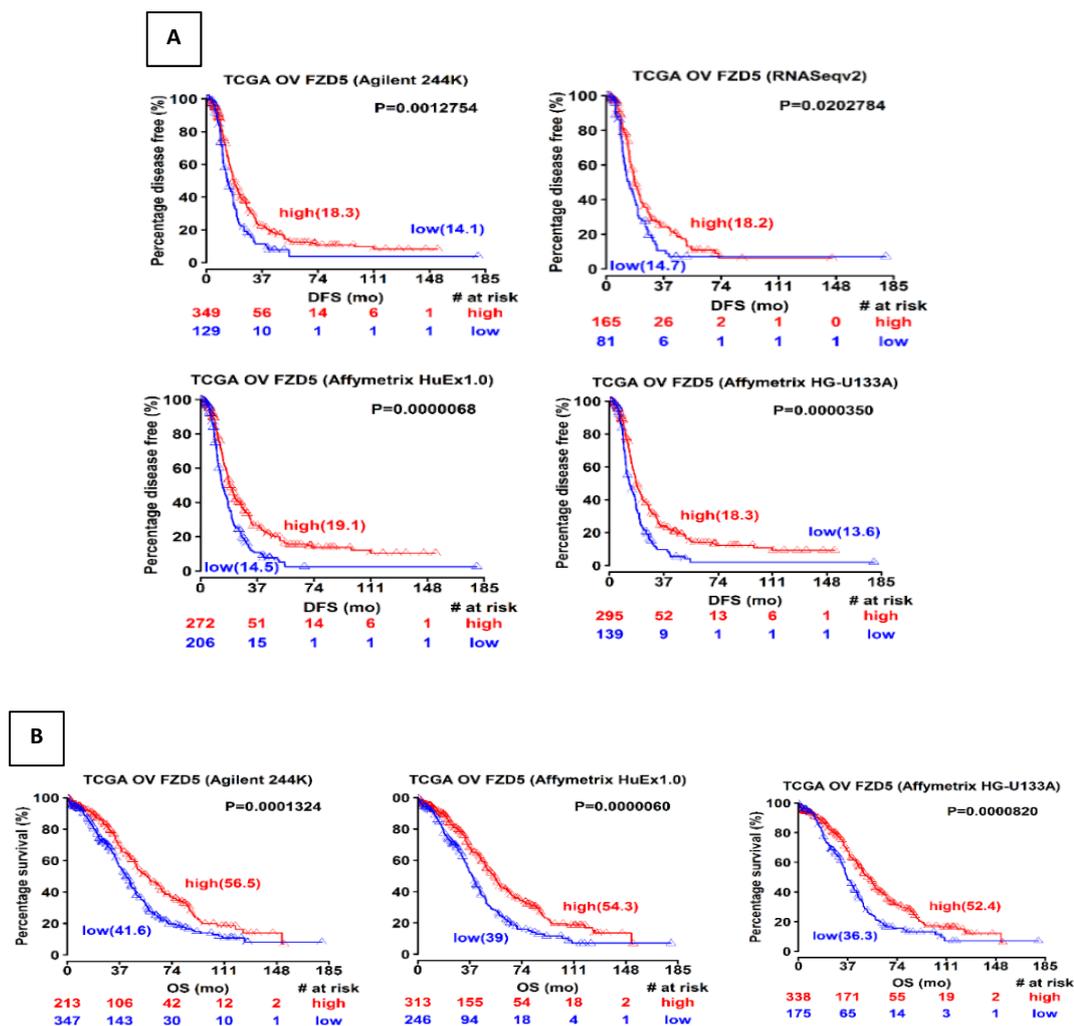


Figura 25 - Expressão do gene FZD5 associado com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global de pacientes com câncer de ovário do TCGA. A- A expressão do gene FZD5 foi associada em todas as plataformas com sobrevida livre de doença B- A expressão do gene FZD5 foi associada a sobrevida global em 3 plataformas (Agilent, Affymetrix-HT-HG-U133A e huex10).

Tabela 5 - Alvos preditos do hsa-miR-934 negativamente correlacionados.

Variável	OS		Variável	HR Análise Multivariada	P
	HR Análise Univariada	P			
Agilent					
FZD5	0,85	0,02	FZD5	0,83	7,08E-10
HMBS	0,80	0,03	HMBS	0,83	1,34E-07
Affymetrix-HT-HG-U133A					
FZD5	0,804094821	0,0006	FZD5		4,92E-09
FZD3	0,866914027	0,0072	FZD3		5,63E-08
Affymetrix huex10					
FZD5	0,789521351	0,0013	FZD5	0,757918097	6,06E-10
SBK1	0,654111875	0,0014	SBK1	0,597538839	7,44E-10
HMBS	0,809046803	0,0352	HMBS	0,863091055	2,96E-07
RNA-SEQ					
HMBS	0,742330009	0,0138	HMBS	0,74148832	0,000056
	DFS				
Variável	HR Análise Univariada	P	Variável	HR Análise Multivariada	P
Agilent					
FZD5	0,878234798	0,0097	FZD5	0,873022264	3,92E-05
Affymetrix-HT-HG-U133A					
FZD5	0,792802373	0,0004	FZD5	0,793740628	6,19E-06
Affymetrix huex10					
FZD5	0,794525285	0,0023	FZD5	0,782206555	7,1E-06
SLC35B4	0,639501646	0,0095	SLC35B4	0,660983204	5,38E-05
RNA-SEQ					
FZD5	0,881291022	0,0351	–	–	–
SKP1	1,41821539	0,0288	–	–	–

A expressão do gene de FZD3 também foi associada com melhor sobrevida global em pacientes com câncer de ovário, do banco de dados TCGA ($p= 0,0008$) (Figura 26A). Além desta associação, nós observamos que o gene de FZD3 também pode ser alvo do hsa-miR-143-3p. Observamos também que nas linhagens celulares tumorais de ovário, a expressão de FZD3 mostrou-se negativamente correlacionada com ambos os miRNAs associados a pior sobrevida de pacientes com câncer de ovário, hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p (Figura 26B).

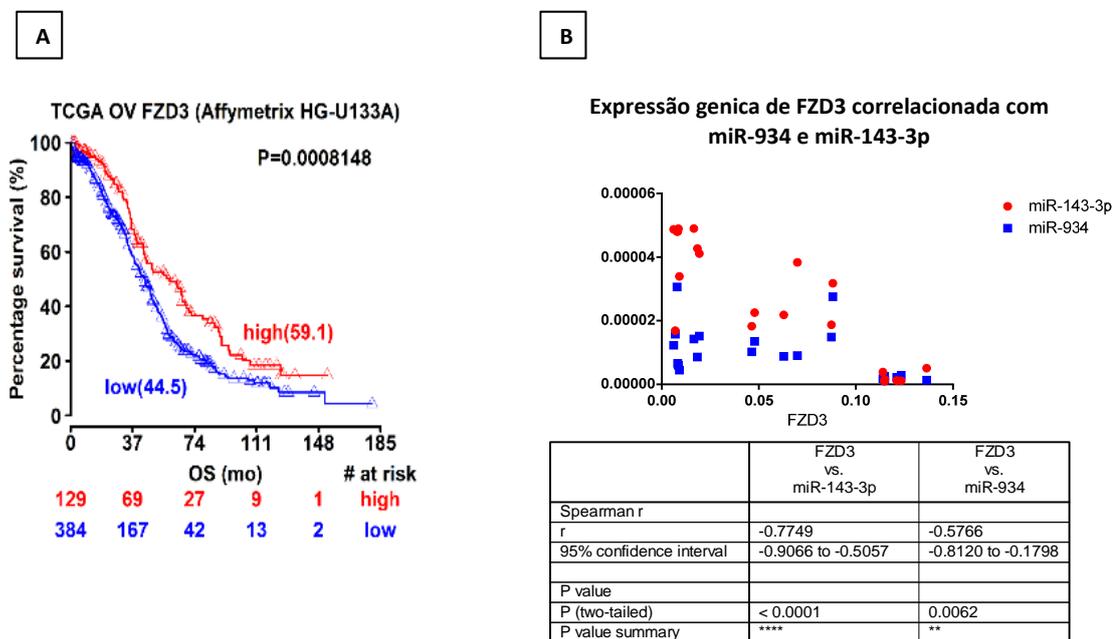


Figura 26 - Sobrevida global de pacientes com câncer de ovário do banco de dados TCGA de acordo com a expressão do gene FZD3 e a correlação negativa entre o gene FZD3 e os miRNAs (hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p). A-Expressão do gene FZD3 associado a melhor sobrevida global de pacientes com câncer de ovário do banco de dados do TCGA. B-Correlação negativa entre o gene FZD3 e os miRNAs miR-934 ($r= -0,5766$, $p= 0,0062$) e miR-143-3p ($r=-0,7749$, $p<0,0001$).

5.10 TRANSFECCÃO

Após 24 horas da transfecção com antagomiR dos miRNAs, hsa-miR-143-3p e hsa-miR-934, a expressão dos miRNAs aumentou em células tratadas em comparação com grupo controle negativo (scramble) (Figura 27-A/B). Observamos que a linhagem celular tratada com o antagomiR miR-934 apresentou uma diminuição significativa para a expressão de FZD5 (Figura 27C), e células tratadas com ambos os antagomiRs, hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p, apresentaram diminuição da expressão de FZD3. Demonstra-se, assim, que ambos os miRNAs, hsa-miR-143-3-p e hsa-miR-934, podem ter o gene FZD3 como um alvo comum (Figura 27D).

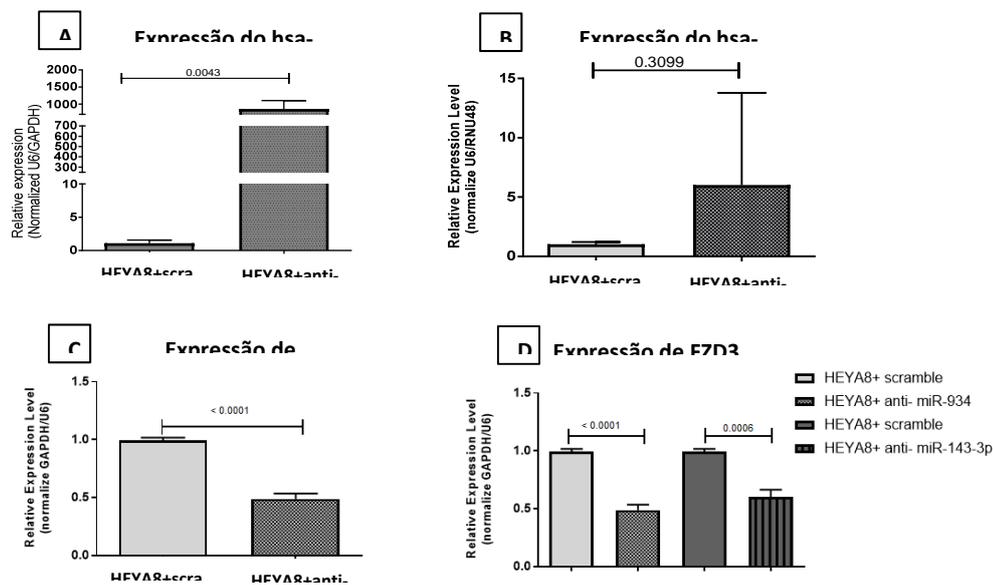


Figura 27 - Transfecção com antagomiR dos miRNAs (hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p) e a expressão dos genes alvo FZD5 e FZD3 antes e após a transfecção. A-Célula transfectada com antagomiR do hsa-miR-143-3p B-Célula transfectada com o antagomiR-934. C- Expressão genica de FZD5 em célula tratada com antagomiR-miR-934 em comparação com grupo controle. D- Expressão do gene de FZD3 em células tratadas com antagomiR-934 e antagomiR-143-3p.

5.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FZD3

Apesar de FZD3 ser um marcador transmembrana, nós observamos que este foi marcado predominantemente no citoplasma e no núcleo de células tumorais de adenocarcinoma seroso de alto grau (Figura 28). Observamos que o aumento da marcação de FZD3 citoplasmática foi associada ao pior prognóstico das pacientes, o ponto de corte para dicotomizar dois grupos foi 20 (Figura 29A). Além disso, a expressão do hsa-miRNA-934 foi encontrada aumentada de forma significativa em amostras com marcação nuclear para FZD3 ($p=0.0202$) (Figura 29B) podendo sugerir, talvez, que o aumento da expressão do miR-934 esteja associado com a inibição da exposição de FZD3 na membrana celular ou que o aumento nuclear de FZD3 estimule de alguma forma a expressão do hsa-miR-934. Uma das hipóteses para tal pode relacionar-se ao fato de o BCL11A ser um dos fatores de transcrição para o gene do MIR-934, além de também alterar a expressão genica de FZD3 (WU et al. 2014).

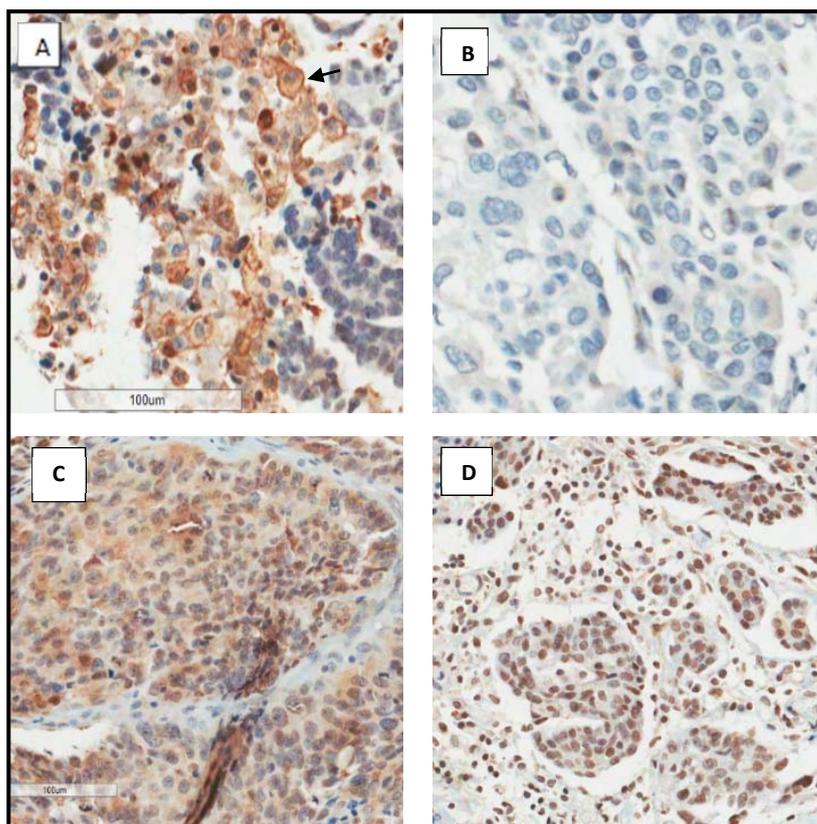


Figura 28 - Expressão de FZD3 em pacientes de adenocarcinoma seroso de alto grau. A- Controle positivo de marcação na membrana celular. B- Amostra negativa para a marcação de FZD3. C- Amostra com alta marcação citoplasmática de FZD3 D- Amostra com alta marcação nuclear de FZD3.

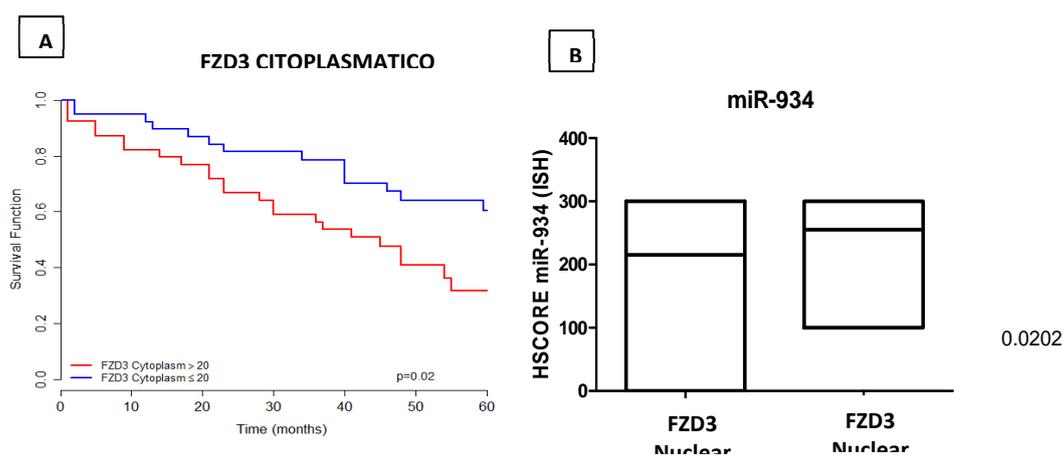


Figura 29 - Expressão citoplasmática de FZD3 em pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau. A - Curva de Kaplan Meier Plot de sobrevida global de FZD3. B - Expressão do miRNA-934 em amostras com marcação nuclear para FZD3.

5.12 BETA CATENINA E O CÂNCER DE OVÁRIO

Tendo em vista que o receptor de FZD3 possui um papel importante na via de WNT/Beta-catenina, buscamos analisar a expressão de beta-catenina nas linhagens celulares de ovário. Observamos que houve uma redução na expressão gênica de CTNNB1 (catenin beta 1) em todas as linhagens tumorais em relação a célula epitelial normal de ovário (HIO-180). Além da diminuição da expressão genica de CTNNB1 nas linhagens tumorais, observamos que houve redução de forma significativa nas células resistentes à quimioterapia em relação à célula parental sensível à quimioterapia (Figura 30A). Interessantemente, observamos que a expressão proteica de Beta-Catenina também foi diminuída nas linhagens tumorais em comparação à linhagem normal e na linhagem resistente ao taxol (SKOV3-TR) em relação a sua linhagem sensível (SKOV3) (Figura 30B).

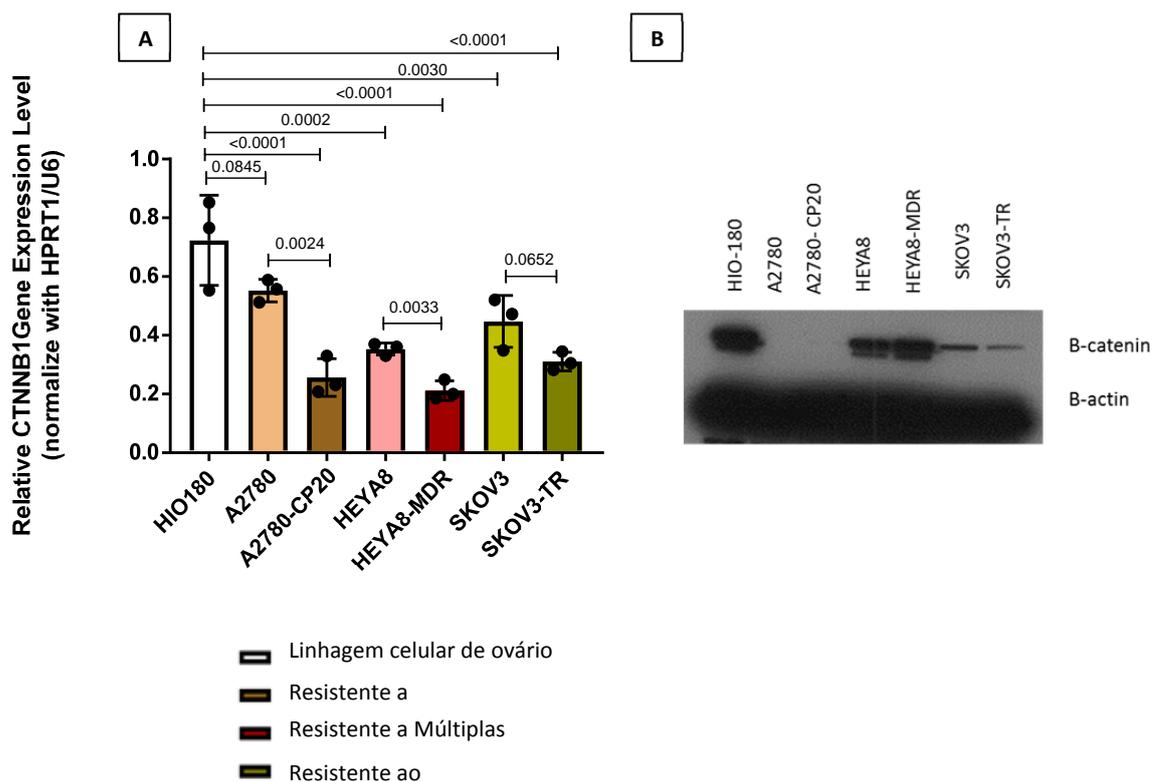


Figura 30 - Expressão genica e proteica de CTNNB1 em células normais e tumorais de ovário. A- Diminuição da expressão genica de CTNNB1 em linhagens tumorais e resistentes a quimioterapia B- Diminuição da expressão proteica de beta-catenina em células tumorais e em SKOV3 resistente ao Taxol.

Todas essas evidências sugerem que, provavelmente, a via canônica WNT/Beta-catenina não esteja ativada nas pacientes com câncer de ovário e que a presença de FZD3 no citoplasma possa estar associada com vias não-canônicas, como a via de polaridade planar.

A expressão proteica de Beta-catenina foi membranar e citoplasmática. Nenhuma amostra apresentou marcação nuclear (Figura 31). Observamos que a expressão de Beta-catenina não foi associada à sobrevida global e livre de doença (Figura 32). A expressão de Beta-catenina não foi correlacionada com a expressão de FZD3. Contudo, observamos que a expressão de beta-catenina estava aumentada em casos positivos para a marcação de FZD3 nuclear ($p=0,057$) (Figura 33).

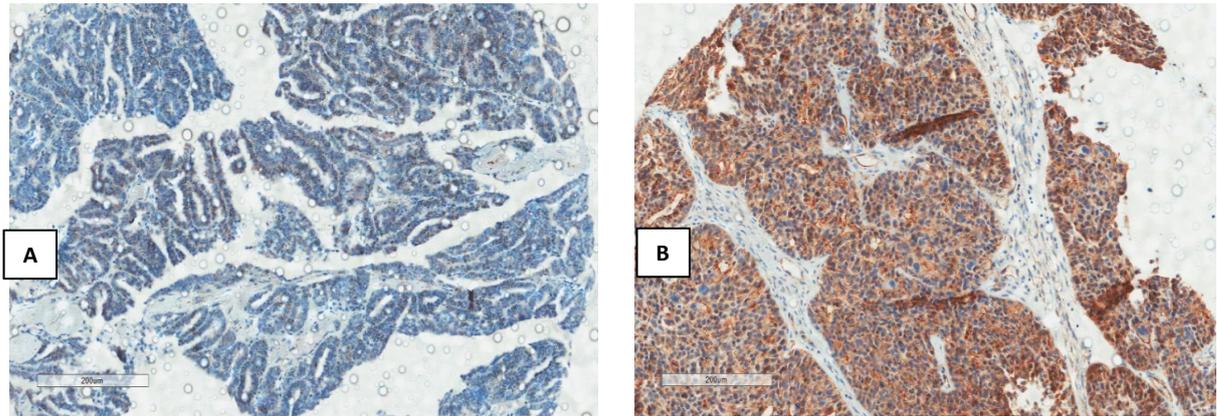


Figura 31 - Expressão proteica de Beta-catenina. A-Amostra com fraca expressão de Beta-catenina, B-Amostra com forte expressão citoplasmática de Beta-catenina.

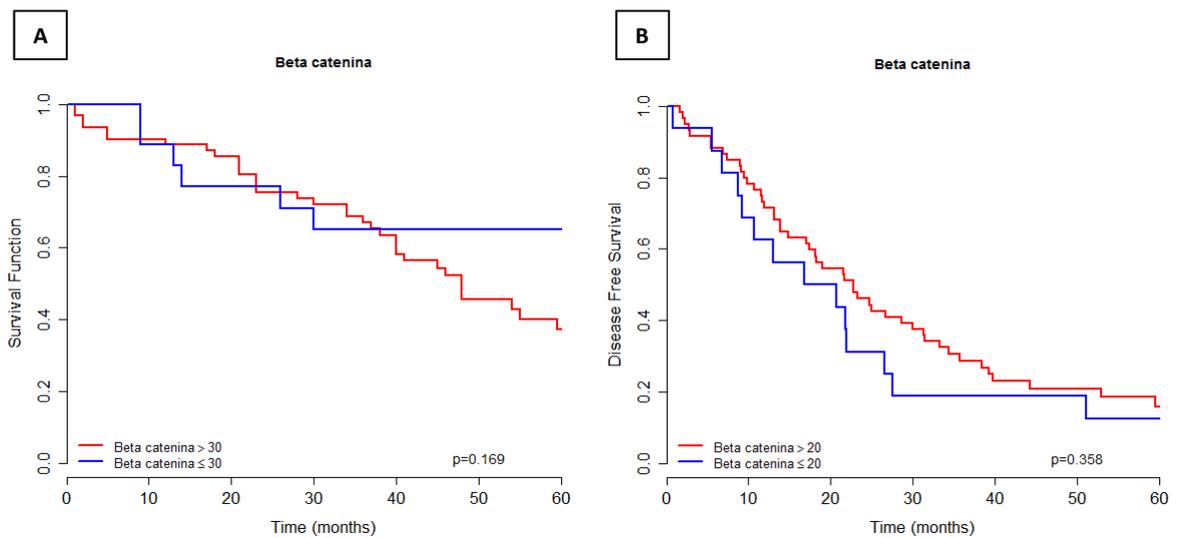


Figura 32 - Curva de sobrevida global e livre de doença em pacientes com adenocarcinoma de ovário associadas com a expressão de Beta-catenina.

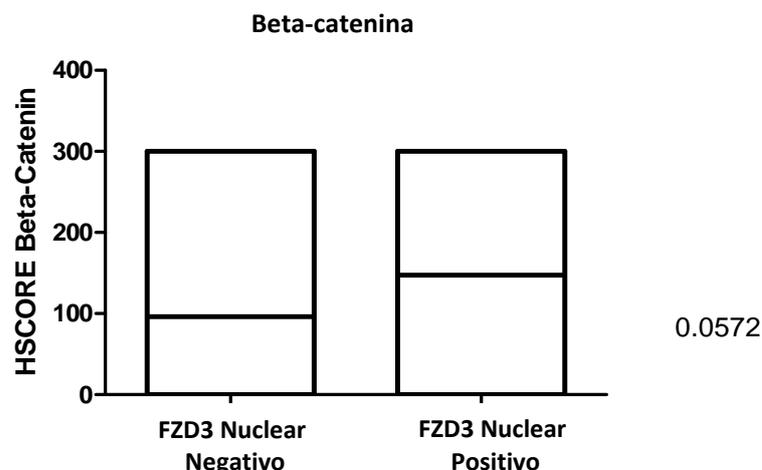


Figura 33 - Expressão de beta-catenina em grupos positivos e negativos para a marcação de FZD3 nuclear.

A expressão de FZD3 não foi associada com a expressão de Beta-catenina, O receptor FZD3 é degradado por proteínas ubiquitinas, RNF43 e ZNRF3 (JIANG et al. 2015). Analisamos a correlação da expressão do FZD3 e RNF43, ZNRF3, usando os dados do TCGA. Existe uma correlação positiva entre a expressão genica de *FZD3* e *RNF43* ($r = 0,2$; $p < 0,0001$) (Figura 34), provavelmente isto pode justificar a expressão de FZD3 no citoplasma em nossas amostras. A expressão das proteínas FZD3 e Beta-catenina foi associada ao tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida global (Apêndice 3 - Tabela S3).

Neste contexto, criamos um modelo hipotético (Figura 35), onde os miRNAs, mir-934 e mir-143, podem reduzir a expressão do gene FZD3 e a degradação do receptor FZD3 pela ubiquitina RNF43 em câncer de ovário. Observamos que não houve associação da expressão do receptor FZD3 e Beta-catenina, sendo assim, sugerimos que outra via, tal como a via não canônica, de polaridade planar, possa

estar envolvida com a expressão citoplasmática de FZD3 no câncer de ovário. Mais estudos são necessários para a confirmação deste modelo hipotético.

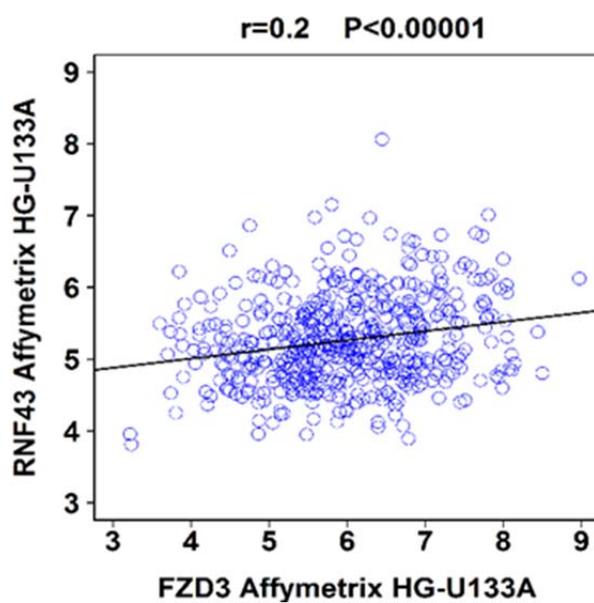


Figura 34 - Correlação positiva entre FZD3 e RNF43 em pacientes com câncer de ovário de banco de dados TCGA.

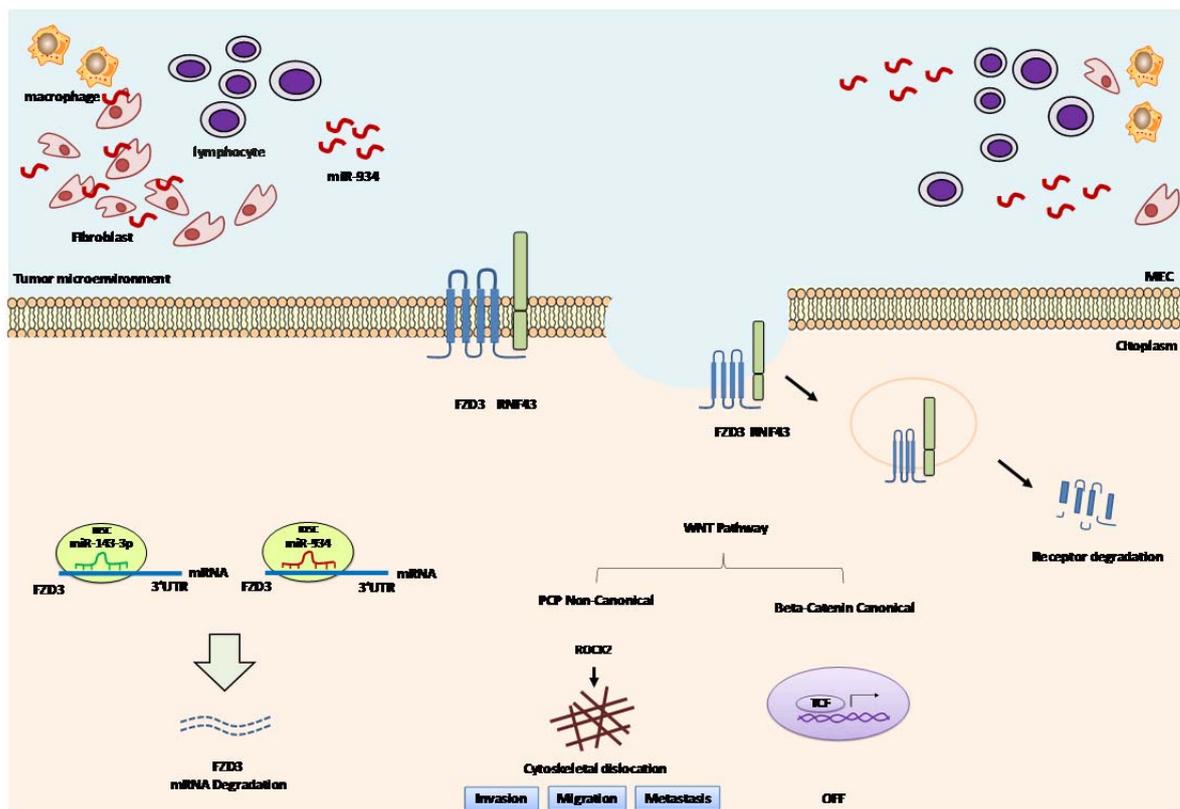


Figura 35- Modelo hipotético da Regulação de FZD3. Os miRNAs, hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p, regulam negativamente a expressão do gene FZD3. O hsa-miR-934 está expresso no microambiente tumoral (fibroblastos) e aumentado em células tumorais. A degradação do receptor FZD3 pode ocorrer através de RNF43, o que poderia justificar a expressão deste receptor no citoplasma. A redução da sinalização do percurso canônico de WNT descarregada pela diminuição de FZD3 e beta-catenina pode ativar vias não-canônicas, como a executada pelo ROCK2, que está envolvida com a migração, invasão e metástase.

6 DISCUSSÃO

Estudos tem comprovado a importância dos miRNAs em diversas doenças, principalmente nos cânceres (AMARAL et al. 2016). O papel dos miRNAs no desenvolvimento, quimiorresistência e metastização do câncer de ovário está bem elucidado (YU et al. 2013; PRAHM et al. 2016). Contudo, sabendo-se da heterogeneidade dos tumores de ovário, em nosso estudo buscamos identificar miRNAs associados ao prognóstico de pacientes clinicamente homogêneas. Todas foram diagnosticadas com o mesmo subtipo histológico, estadiamento clínico, ausência de tratamento neoadjuvante, submetidas a citorredução ótima e tratadas com carboplatina e taxol.

O perfil de miRNAs alterados no câncer de ovário já tem sido investigado em outros estudos, contudo com casuísticas heterogêneas (LI et al. 2014). Observamos em nosso estudo que 365 miRNAs foram diferencialmente expressos entre os tecidos tumorais e as amostras normais de tuba de falópio provenientes de histerectomia por leiomioma. Dentre estes 158 miRNAs apresentaram hiporregulação e 207 miRNAs foram hiperexpressos nos tecidos tumorais, sendo o miR-34b-5p o mais hipoexpresso, com fold-change de -98,6, e o miR-663b foi o mais aumentando em relação ao tecido normal, com o FC de 7,1.

Na literatura ainda não está associado o papel do hsa-miR-34b-5p com a progressão do câncer de ovário, contudo, os miRNAs da família hsa-miR-34 são considerados como supressores tumorais e apresentam um papel importante na via de p53 em outros tipos tumorais. A reativação de p53 levou à indução significativa de

transcrições dos miRNAs primários e maduros da família dos hsa-miR-34 (HE et al. 2007). Tendo em vista que os adenocarcinomas serosos de alto grau apresentam mutação no gene supressor tumoral de p53 em aproximadamente 96% dos casos de adenocarcinoma seroso de alto grau e que tais mutações causam a perda da função de p53 (COLE et al. 2016), podemos pressupor que tal hipo-regulação do hsa-miR-34b-5p seja devido às altas taxas de mutação em p53, uma vez que todas as nossas amostras eram do tipo seroso de alto grau. Em linhagem celular de superfície do epitélio ovariano primário, foi demonstrado que a inativação de p53 altera o papel de MET, um receptor tirosina quinase, crucial na regulação do crescimento invasivo, e um dos principais mecanismos se dá através da desregulação do miR-34 que tem como alvo MET (HWANG et al. 2011). Observou-se que em linhagem celular de adenocarcinoma de mama, a transfecção do mimic do hsa-miR-34b-5p reduziu o crescimento celular com mais eficiência do que miR-34b e foi capaz de mudar a morfologia da célula bem como o miR-34C. Além disso, a migração celular foi reduzida após tratamentos com todas as três isoformas (hsa-miR-34b, hsa-miR-34b-5p e hsa-miR-34C), com mais eficiência para ambos os hsa-miR-34b -5p e hsa-miR-34C (ENGKVIST et al. 2017). Todos estes estudos demonstram que a família do hsa-miR-34 é um importante grupo de miRNAs com efeitos antitumorais, entretanto, ainda pouco se sabe do papel específico do hsa-miR-34b-5p em pacientes de adenocarcinoma seroso de alto grau.

Em nosso estudo, o hsa-miR-663b foi o miRNA que apresentou o maior fold change nas amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau em relação ao controle normal, entretanto, este miRNA ainda não foi descrito em pacientes com câncer de ovário. Recentemente, foi demonstrado que a inibição deste miRNA diminuiu

significativamente a habilidade de proliferação celular de osteossarcoma e que seu papel oncogênico pode se dar pela inibição do alvo TP73 (Tumor Protein p73), sendo assim, este miRNA pode ser considerado um potencial alvo terapêutico (SHU et al. 2018). Dentre um perfil de miRNAs capazes de diferenciar o carcinoma de cólon e retal entre a mucosa normal, o hsa-miR-663-b apresentou um aumento significativo em casuísticas independentes (PELLATT et al. 2016). Interessantemente foi visto que a Interleucina 21 (IL-21) pode modular a expressão de diversos genes e miRNAs em linfócitos B de pacientes com leucemia linfóide crônica, fazendo a comunicação entre o tumor e o microambiente tumoral. Dentre os miRNAs que podem ser modulados pela IL-21, destaca-se o hsa-miR-663-b (DE CECCO et al. 2015). Outra aplicação já identificada para o hsa-miR-663 foi no auxílio ao diagnóstico do câncer de bexiga, uma vez que este miRNA foi reportado aumentado no plasma dos pacientes oncológicos em relação ao controle normal. Tendo em vista a estabilidade dos miRNAs no plasma, este miRNA é um promissor biomarcador circulante na detecção do câncer de bexiga (DU et al. 2015). Apesar de muitos estudos apontarem a importância do hsa-miR-663-b no desenvolvimento de diversos tumores, ainda não se sabe o papel deste miRNA no câncer de ovário. Torna-se importante a melhor investigação deste miRNA em amostras de pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau, haja vista nosso estudo ter identificado que o miR-663-b apresentou o maior *fold-change* nas amostras tumorais em relação ao grupo controle.

Dentre os genes alvos preditos para os miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de carcinoma seroso de alto grau e controles normais, utilizando informações do banco de dados do TCGA, observamos que 613 genes apresentaram correlação negativa com a expressão dos miRNAs de forma estatisticamente

significativa, sendo 89 miRNAs e 450 mRNAs. A análise de enriquecimento desses genes foi semelhante aos resultados encontrados no trabalho de LI et al. (2014), que também observaram o enriquecimento dos genes-alvos de miRNAs diferencialmente expressos em adenocarcinoma seroso de alto grau associados com vias do ciclo celular e apoptose. Dentre os 89 miRNAs com a expressão alterada e negativamente correlacionados com potenciais mRNAs alvos, os membros da família hsa-miR-29 e hsa-let-7 foram os miRNAs com maior número de alvos preditos e negativamente correlacionados. O hsa-miR-29a-3p apresentou 42 alvos preditos negativamente correlacionados e o hsa-let-7b-5p 39 alvos negativamente correlacionados. Em nosso estudo, os membros da família hsa-miR-29 e hsa-let-7 foram identificados como hipoexpressos. Estes miRNAs também se mostraram hiporregulados em diferentes tipos de cânceres, como em câncer de pulmão, próstata e ovário em outros estudos (PLAISIER et al. 2012; CAI et al. 2013) sendo, portanto, considerados como miRNAs supressores tumorais.

Um dos principais desafios em relação ao câncer de ovário é a identificação de marcadores capazes de prever a resposta terapêutica para auxílio no prognóstico das pacientes. Muitos estudos têm buscado marcadores capazes de assessorar a conduta clínica. Contudo, na maioria destes, as amostras são heterogêneas e apresentam distintas etiologias (YU et al. 2013; PRAHM et al. 2016). Buscamos, em nosso estudo, avaliar a expressão global de miRNAs associados à evolução clínica de pacientes com características clínicas homogêneas.

O único miRNA identificado neste estudo que foi associado ao tempo de recidiva após o tratamento de quimioterapia foi o hsa-miR-503-5p. Observamos que o aumento da expressão deste miRNA aumentou progressivamente de forma

significativa em pacientes com menor tempo de recidiva após o término da quimioterapia. O aumento da expressão do hsa-miR-503-5p foi identificado em tumores não-responsivos (pacientes recidivados em menos de um ano) comparado a pacientes não recidivados ou recidivados após um ano do término da quimioterapia. Este marcador apresentou 100% de sensibilidade e 89,5% de especificidade (AUC = 0.965, CI = 1.000-0.899) em prever a recaída em menos de um ano após o último ciclo de quimioterapia. Já se sabe que o intervalo livre de platina é considerado um fator preditivo para pacientes com câncer de ovário recidivadas (FOLEY et al. 2013). Tendo em vista que pacientes que não recidivam em até dois anos após o término da quimioterapia apresentam aproximadamente 60% de taxa de resposta (FOLEY et al. 2013), comparamos os miRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que recidivam em até 2 anos após o término da quimioterapia versus pacientes não recidivados em 2 anos. Observamos que o hsa-miR-503-5p foi hiperexpresso em pacientes recidivadas em menos de 2 anos. Contudo, nas linhagens celulares observamos que o hsa-miR-503-5p se encontrou hipoexpresso na linhagem HEYA8 resistente a múltiplas drogas (HEA8-MDR) em relação a sua linhagem parental sensível. O papel deste miRNA no câncer de ovário ainda é controverso na literatura.

O hsa-miR-503 foi encontrado hiper-regulado em células de carcinoma ovariano positivas para ALDH1 (marcador de células-tronco tumorais). A alta expressão do miR-503 foi significativamente associada com o estadiamento clínico e com metástase distante. O marcador ALDH1 e alta expressão do hsa-miR-503 foram significativamente implicados na quimiorresistência e na progressão tumoral do câncer de ovário (PARK et al. 2013). Todavia, recentemente foi descrito que o miR-

503 foi capaz de sensibilizar o tratamento de cisplatina em células de câncer de ovário, tendo PI3K P85 como alvo (WU et al. 2018).

Identificamos potenciais biomarcadores de prognóstico. Observamos que amostras com menor expressão de hsa-miR-29a-5p ($p = 0,007$) e hsa-miR-663a ($p = 0,047$) e com maior expressão de hsa-miR-23a - 3P ($p = 0.033$), hsa-miR-143-3p ($p = 0,044$), hsa-miR-455-3p ($p = 0,044$) e hsa-miR-934 ($p = 0.049$) apresentaram menor sobrevida global. Todos estes miRNAs já têm sido associados com tumores (ZHU et al. 2012; MUÑOZ-RODRÍGUEZ et al. 2015). No entanto, existem estudos limitados destes miRNAs em pacientes com câncer de ovário.

Dentre os miRNAs associados à sobrevida global, o hsa-miR-934 foi validado em pacientes independentes do banco de dados do TCGA e em diferentes amostras através da hibridização *in situ*. A alta expressão do hsa-miR-934 foi associada com pior sobrevida global nas amostras deste estudo, em pacientes do TCGA além de este miRNA ser associado à pior taxa de sobrevivência, foi também associado ao pior tempo de sobrevida livre de doença. Apesar de nenhum outro estudo ter demonstrado a função deste miRNA no desenvolvimento e na progressão do câncer de ovário, recentemente foi visto que o aumento da expressão do hsa-miR-934 também já foi associado à pior sobrevida global de pacientes com câncer colorretal (SLATTERY et al. 2018). SAAD et al. (2015) demonstraram o papel crucial deste miRNA na patogênese e na progressão do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, além disso, observaram que a inibição destes miRNA aumentou a sensibilidade à cisplatina e reduziu a invasão celular. Observamos também que este mesmo miRNA provavelmente tem um papel no desenvolvimento do câncer de ovário. Isto porque foi observado seu aumento em amostras de tumor em comparação ao controle

normal, em todas as casuísticas analisadas e em diferentes técnicas empregadas. Ademais, identificamos que as amostras de metástase também apresentaram maior expressão deste miRNA em relação ao tumor primário.

A alta expressão do hsa-miR-934 também já foi observada em pacientes com câncer do tipo triplo-negativo basal-like comparado a outros fenótipos de câncer de mama menos agressivos (CASTILLA et al. 2014). Todos esses achados, em nosso estudo e na literatura, demonstram o potencial papel agressivo do hsa-miR-934 em diversos tumores. Interessantemente, ainda não foi relatado o papel deste miRNA em pacientes com câncer de ovário, e o nosso estudo será o primeiro a demonstrar a importância deste miRNA em pacientes com carcinoma seroso de ovário.

Além da expressão deste miRNA no tumor, observamos também que o hsa-miR-934 está expresso em fibroblastos do microambiente tumoral e que a expressão deste miRNA foi positivamente correlacionada entre células tumorais e fibroblastos, indicando que quanto maior a expressão do hsa-miR-934 no tumor, maior a expressão deste miRNA no microambiente tumoral. Este dado nos chamou atenção pela importância da influência dos fibroblastos ativados, os chamados fibroblastos associados ao câncer (CAFs), na tumorigênese. É descrito que estes secretam fatores parácrinos, tais como fatores de crescimento, quimiocinas e exossomos. Contudo, os mecanismos moleculares responsáveis pela ativação de fibroblastos e regulação do microambiente metastático ainda não estão elucidados (EICHELMANN et al. 2018). Estudos adicionais precisam ser realizados para a confirmar se o hsa-miR-934 pode ser transferido para os fibroblastos e desempenhar um papel importante no microambiente tumoral.

A inflamação e o recrutamento de células inflamatórias são importantes para o desenvolvimento do câncer e a ativação dos fibroblastos participa da conexão entre o estroma e as células inflamatórias (HANAHAN e WEINBERG 2000). No câncer de ovário os fibroblastos contribuem para metástase, promovendo a angiogênese e a invasão celular (ZHANG et al. 2011). Atualmente tem sido considerado como um bom alvo para a terapia (LEI et al. 2016). Recentemente, foi visto que o aumento do hsa-miR-934 e de outros miRNAs foi associado com a desregulação da via de NFκB (nuclear factor kappa B), um importante regulador da resposta imunológica, através de seu alvo TNFSRF11A (RANK) (TNF receptor superfamily member 11a) em câncer de colorretal (SLATTERY et al. 2018).

Os achados deste estudo quando associados à literatura podem sugerir que o hsa-miR-934 possivelmente exerce uma modulação entre os processos de inflamação e resposta imunológica em fibroblastos de pacientes com câncer de ovário.

Outro miRNA associado a pior sobrevida global em nosso estudo foi o hsa-miR-143-3p. A análise de dados do TCGA demonstrou um aumento significativo deste miRNA no grupo de pacientes que morreram em até 6 meses em relação ao grupo de pacientes que não morreram em até 2 anos. Este mesmo resultado foi observado em duas diferentes coortes do banco de dados. Apesar do interessante resultado, este miRNA não foi validado nas pacientes deste estudo pela técnica de ISH. O papel do hsa-miR-143-3p parece depender do contexto celular, uma vez que este miRNA já foi relatado como sendo supressor tumoral no carcinoma de células escamosas do esôfago (HE et al. 2016), osteossarcoma (SUN et al. 2018), câncer de cólon (GOMES et al. 2018), apesar de também poder promover a proliferação celular em células de mama (JOHANNESSEN et al. 2017).

Além do hsa-miR-143-3p, observamos que outros miRNAs do mesmo cluster, os miRNAs hsa-miR-145-3p e hsa-miR-145-5p estavam menos expressos em amostras tumorais e amostras metastáticas ao comparar com as amostras normais, e em linhagens celulares tumorais comparando-se a linhagem de epitélio normal. Outros estudos corroboram este achado e demonstram que o papel do hsa-miR-143-3p é o de supressor tumoral no câncer de ovário (WANG et al. 2016; SHI et al. 2018). Todavia, apesar dos resultados da comparação entre tumor e amostras normais apontarem este miRNA como supressor tumoral, observamos que o aumento deste miRNA foi associado ao pior prognóstico, tendo os pacientes com menor tempo de sobrevida um aumento significativo da expressão do hsa-miR-143-3p. Além do nosso trabalho, MARCHINI et al. (2011), validaram uma assinatura de 11 miRNAs capazes de diferenciar pacientes com câncer de ovário recidivadas. Dentre os miRNAs encontrados no estudo, o hsa-miR-143 foi significativamente elevado em pacientes recidivadas em comparação às pacientes não recidivadas (MARCHINI et al. 2011). Ademais, foi visto em outro estudo que pacientes com câncer de ovário que apresentaram maior expressão do miR-143 tiveram uma redução significativa na sobrevida global (PANDYA et al. 2014).

O hsa-miR-143 e o hsa-miR-145 têm sido amplamente descritos como supressores de tumor. Todavia, têm surgido descobertas sugerindo o papel crítico destes miRNAs no estroma e não nas células epiteliais (ALMEIDA e CALIN 2016). DIMITROVA et al. (2016) descobriram que a exclusão tumoral-específica do cluster miR-143/145, em um modelo de animais de adenocarcinoma pulmonar, não afetou o desenvolvimento tumoral. Surpreendentemente, o cluster miR-143/145 promoveu o crescimento do tumor no microambiente tumoral, estimulando a proliferação de

células endoteliais. Em animais deficientes para o miR-143/miR-145, a atividade de neogênese foi reduzida. Este efeito foi parcialmente explicado pelo hsa-miR-145 ter como alvo a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina ID (Camk1d) - uma proteína envolvida na angiogênese (DIMITROVA et al. 2016). Os tecidos são constituídos de diversas células, como células epiteliais, mesenquimais, endoteliais, pericitos, células do sistema imunológico, como neutrófilos e monócitos e células capazes de migrar ou proliferar no tecido devido ao estado da doença, como por exemplo fibroblastos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos. Em um tecido, as células podem variar amplamente em proporções de acordo com o indivíduo ou pelo processo de uma determinada doença (KENT et al. 2014).

Buscamos compreender o papel desempenhado pelo hsa-miR-143-3p no microambiente tumoral do câncer de ovário. Observamos pela técnica de ISH que o hsa-miR-143-3p estava altamente expresso em fibroblastos e no infiltrado inflamatório. Ao compararmos a expressão do miR-143-3p entre linhagens celulares de câncer de ovário e THP1 observamos que THP1 apresentou um aumento da expressão do hsa-miR-143-3p substancialmente significativa em comparação as linhagens de câncer de ovário. Sugere-se, assim, que o hsa-miR-143-3p associado a pior sobrevida global nas pacientes com câncer de ovário poderia ser proveniente de células do infiltrado inflamatório. THP-1 é uma linhagem celular de monócito, de leucemia humana, que tem sido extensivamente usada para estudar funções de monócitos/macrófagos e um modelo usado para avaliar a modulação das atividades de monócitos e macrófagos (CHANPUT et al. 2014).

Além do aumento da expressão do hsa-miR-143-3p em THP1, observamos também que este miRNA foi significativamente aumentado em macrófagos M0 em

relação as células de ovário. Interessantemente, ZHANG et al. (2013), demonstraram que a expressão deste miRNA foi aumentada em M2 em relação a M1, demonstrando que este miRNA pode exercer um papel fundamental na polarização dos macrófagos. Os macrófagos do tipo M1 são classicamente considerados como supressores tumorais, em oposição aos macrófagos do tipo M2 que são descritos por promoverem o crescimento tumoral. Já foi visto que a diminuição da razão entre M1/M2 reforçou a progressão do câncer de ovário (LIU et al. 2015).

Apesar de todos os indícios demonstrarem a importância do miRNA no microambiente tumoral, em nosso estudo nós não conseguimos comprovar esta relação. O hsa-miR-143-3p no infiltrado inflamatório, apesar de muito expresso, não foi associado à sobrevida das pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau. Entretanto, a nossa análise de ISH não foi realizada em amostras de corte inteiro e sim em amostras contidas no TMA, sendo que na maioria dos casos não foi possível avaliar a presença do infiltrado inflamatório.

Tendo em vista a importância de ambos os miRNAs, hsa-miR-934 e hsa-miR-143, no prognóstico das pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau, nós buscamos por alvos destes miRNAs a fim de melhor entender os mecanismos destes miRNAs no câncer de ovário.

Dentre os 303 genes preditos como alvo do miR-934, 6 apresentaram correlação negativa com o miRNA nas amostras do TCGA. Destes genes, identificamos que 4 genes foram associados com a sobrevida global, (SBK1, HMBS, FZD3, FZD5) e 2 genes foram associados de forma independente com sobrevida livre de doença (SLC35B4 e FZD5).

O envolvimento do gene *SBK1* (*Quinase do domínio SH3-ligação 1*) já foi descrito na patogênese de cânceres humanos, incluindo o câncer de ovário. Contudo, os mecanismos envolvidos na regulação do gene *SBK1* e sua função na progressão dos tumores ainda não está bem elucidada (WANG et al. 2011). O gene *HMBS* codifica um membro da superfamília hydroxymethylbilane sintase. Esta proteína está envolvida na biossíntese do grupo heme. Mutações neste gene já foram identificadas em tumores de fígado (SCHNEIDER-YIN et al. 2015), entretanto ainda não se sabe sobre a participação deste gene em câncer de ovário. Além dos alvos preditos para o hsa-miR-934 associados com sobrevida global, o gene *SLC35B4* foi associado à sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de ovário do banco de dados do TCGA. Este gene é uma glicosiltransferase e tem a função de transportar açúcares e nucleotídeos do citoplasma para o aparelho de Golgi, onde eles são utilizados na síntese de glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos (ASHIKOV et al. 2005). Recentemente foi descoberto que o polimorfismo rs1646724 pode alterar a expressão de *SLC35B4* e essa alteração foi associada ao pior prognóstico de pacientes com câncer de próstata (HUANG et al. 2018). Apesar de este gene ser pouco estudado e associado à progressão de tumores, já foi descrito que alterações no padrão de glicosilação têm funções importantes no câncer de ovário, tais como na adesão, controle de respostas imunes, transporte de proteína e participação em vias de sinalização como Notch, Wnt e TGF β (ALLAM et al. 2015).

Identificamos que diversos alvos potenciais do hsa-miRNA-934, negativamente correlacionados, podem ser interessantes para o entendimento do papel deste miRNA no câncer de ovário. Todavia, observamos em uma análise multivariada que ambos os genes *FZD3* e *FZD5* foram associados à sobrevida global

de pacientes com câncer de ovário. Este dado foi interessante pois estes dois genes pertencem à mesma família, a família de receptores Frizzled (FZD) que são receptores de membrana que participam das vias canônicas e não-canônicas de WNT (CORDA e SALA 2017). Esta via desempenha um importante papel em mecanismos fisiológicos e também no desenvolvimento de vários tumores (POLAKIS 2012), incluindo o câncer de ovário (BOONE et al. 2016).

Observamos que as linhagens SKOV3 apresentaram menor expressão de ambos os miRNAs em relação as outras linhagens tumorais HEYA8 e A2780. HUANG et al. (2013) demonstraram elegantemente que existem diferentes graus na transição epitélio-mesenquima, a linhagem SKOV3 foi considerada como intermediária M e as linhagens tumorais HEYA8 e A2780 apresentaram mais características mesenquimais, sendo diferenciadas pela perda de expressão de pancitoqueratina. Neste trabalho foi sugerido que os carcinomas de ovário ganham características mesenquimais antes de perderem completamente as características epiteliais (HUANG et al. 2013). Podemos sugerir que o aumento da expressão dos miRNAs hsa-miR-143-3p e hsa-miR-934 pode reduzir a expressão genica de *FZD3* e *FZD5* e este mecanismo pode estar envolvido com o processo de transição epitélio-mesênquima.

O gene FZD3 foi identificado em pelo menos 4 algoritmos como alvo para os miRNAs, hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p. Interessantemente, observamos uma correlação negativa entre o gene FZD3 e ambos os miRNAs em linhagens celulares de câncer de ovário. O aumento da expressão dos miRNAs hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p foi associado ao pior tempo de sobrevida global de pacientes com câncer de ovário em nosso estudo. Ademais, observamos que o aumento da expressão genica

de FZD3 foi associado ao melhor prognóstico de pacientes do banco de dados do TCGA. Outros estudos já demonstraram que a redução genica de FZD3 em câncer de ovário foi envolvido com a progressão do tumor (TAPPER et al. 2001) e pior resposta à quimioterapia intraperitoneal (SEAGLE et al. 2016).

A expressão e a localização proteica de FZD3 foi avaliada através da técnica de imuno-histoquímica em TMA com amostras de adenocarcinoma seroso de alto grau. Ao contrário do que esperávamos, não observamos a expressão de FZD3 na membrana celular, toda a marcação de FZD3 foi observada no citoplasma e no núcleo das células tumorais. A expressão nuclear de FZD3 foi associado ao aumento da expressão do hsa-miR-934 de forma significativa, além disso, o aumento de FZD3 no citoplasma foi associado com pior sobrevida global, ao contrário da expressão genica FZD3. Aparentemente a expressão regulatória de FZD3 parece ter mecanismos complexos, uma vez que observamos uma possível regulação gênica realizada pelos hsa-miR-143-3P e hsa-mir-934 e que a hiporregulação genica foi associada ao pior prognóstico, enquanto que o aumento do nível de proteína citoplasmático foi associado ao pior prognóstico de sobrevida global de pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau. Provavelmente outros eventos pós-transcricionais ou pós-traducionais estão envolvidos na regulação desta proteína.

Alguns estudos têm descrito mecanismos que regulam a localização de FZD3, entre estes, é possível destacar o mecanismo de degradação do receptor através das enzimas RNF43 e da ubiquitina ZNRF3 (JIANG et al. 2015). A correlação entre FZD3, RNF43 e ZNRF3 foi feita usando os dados do TCGA e uma correlação positiva foi encontrada entre a expressão genica de FZD3 e de RNF43 em pacientes com câncer de ovário. A expressão proteica de RNF43 é membranar e esta pode

internalizar FZD3 para a degradação via ubiquitinas (JIANG et al. 2015). Assim, a presença de FZD3 no citoplasma poderia ser justificada por este mecanismo. Além da degradação, a presença e assimetria de FZD3 na membrana parece ser dependente de Vangl2 (MONTCOUQUIOL et al. 2006). A internalização de FZD3 através de VANGL2 também está bem estabelecida. Vangl2 reduz a fosforilação de FZD3 e promove a internalização do receptor, induzindo assim a sinalização da via de polaridade planar e de aderência celular (SHAFER et al. 2011).

O papel de FZD3 no desenvolvimento tumoral ainda é controverso. Em câncer de mama foi visto que o WNT-5a ativa o receptor frizzled-3 e induz a sinalização da via de GS/Camp/pKa, resultando em uma ação antimigratória e representando um mecanismo pelo qual o WNT-5a pode inibir a migração celular de câncer de mama (HANSEN et al. 2009). Contudo, o receptor FZD3 foi visto significativamente aumentado em amostras de câncer de colorretal em relação a amostras de epitélios normais e de adenomas. No mais, o aumento da expressão foi associado ao menor tempo de sobrevida e de recorrência em pacientes com carcinoma de colorretal (WONG et al. 2013). Em nosso estudo, observamos que a expressão citoplasmática de FZD3 foi associada à pior sobrevida global das pacientes com câncer de ovário - resultado condizente com o trabalho de WONG et al. (2013) que também identificou que a expressão proteica de FZD3 no citoplasma foi associada ao pior prognóstico em câncer de colorretal. Apesar de não ter sido encontrado uma marcação de FZD3 na membrana celular, os autores justificaram que o cromogênio pode ter produzido uma mancha espessa na membrana que era semelhante à coloração do citoplasma.

Ainda não se sabe o papel de FZD3 no citoplasma celular de tumores. Todavia, a via de WNT é um dos mecanismos envolvidos na orientação dos neurônios e já foi descrito que a via de polaridade planar é inibida através da fosforilação de FZD3, que por consequência permanece na membrana plasmática. A presença local de VANGL2 previne a fosforilação de FZD3, resultando na internalização de FZD3 que promove a ativação da via de polaridade planar (AVILÉS et al. 2013). Interessantemente, dados do TCGA têm indicado que tanto VANGL1 quanto VANGL2 estão hiperregulados em amostras de câncer de ovário e que a via de polaridade planar contribui para a progressão tumoral (HATAKEYAMA et al. 2014).

Os receptores de frizzled (FZD), são membros da família de receptores acoplados a proteína-G (GPCRs) e são conhecidos por mediar a sinalização da via de WNT (CHAN e LO 2018). Buscamos compreender a relação entre a expressão de FZD3 e de Beta- catenina nas pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau do nosso estudo. A análise de β -catenina no TMA demonstrou que amostras com expressão nuclear de FZD3 apresentaram aumento da expressão de β -catenina. Contudo, não observamos associação da expressão de β -catenina com a sobrevida global e nem recorrência em nossa casuística. No entanto, estudos sugerem que a expressão elevada de β -catenina foi relacionada com o pior prognóstico e com o fenótipo agressivo no câncer de ovário (SKY et al. 2017). Nas linhagens celulares, observamos que a redução da expressão genica de *CTNNB1* foi vista em todas as células resistentes comparado às linhagens parentais sensíveis à quimioterapia. NAGY et al. (2017) relataram que a translocação de β -catenina do citoplasma para o núcleo desempenha um importante papel na predição da sensibilidade à platina e que

a positividade de β -catenina nuclear foi associada à melhor sobrevida global em pacientes com câncer de ovário. Contudo, em nosso estudo, não observamos a presença de β -catenina no núcleo, a expressão de β -catenina foi citoplasmática e membranar, o que nos sugere a provável inativação da via canônica de WNT. Já foi demonstrado que a sinalização da via WNT não-canônica pode antagonizar a via canônica de WNT (HANSEN et al. 2009). Os receptores FZD enviam sinais intracelulares através da via canônica e não canônica de WNT (WONG et al. 2013). A via não canônica está envolvida na migração, invasão e metástase (WANG et al. 2016). Tendo em vista todos esses achados, sugerimos que a expressão citoplasmática de FZD3 possa ativar a via não-canônica nas pacientes de adenocarcinoma seroso de alto grau diagnosticadas em estadiamento clínico avançado.

Nossos resultados mostraram que o hsa-miR-934 tem um valor prognóstico nas pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau e possivelmente regula a expressão genica de FZD3 e FZD5, que são membros da via de WNT. Observamos que ambos os potenciais alvos do hsa-miR-934 têm valor prognóstico para pacientes com câncer de ovário. Para tentar integrar as nossas descobertas, criamos um modelo hipotético, onde o hsa-miR-934 e o hsa-miR-143-3p regulam negativamente a expressão gênica de FZD3. A expressão do hsa-miR-934 foi também observada no microambiente tumoral, principalmente em fibroblastos e esta expressão foi positivamente correlacionada entre a expressão tumoral do hsa-miR-934. Além disso, outros mecanismos celulares podem convergir para a redução do receptor FZD3, como a degradação através de RNF43. A redução da sinalização da via canônica de WNT pode ativar vias não-canônicas responsáveis por regular eventos de migração.

No contexto de tumores avançados, os processos de invasão e metástase são decisivos para a sobrevivência do tumor. Entender o papel do hsa-miR-934 e sua interação com FZD3 é necessário para compreendermos os mecanismos responsáveis pela evolução da doença e redução da sobrevida de pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau. Mais estudos são necessários para a confirmação das nossas descobertas apresentamos aqui. Neste estudo destacamos a importância do hsa-miR-934 como marcador prognóstico e para progressão do adenocarcinoma seroso de alto grau.

7 CONCLUSÃO

Identificamos diferença de expressão no perfil de miRNAs em amostras homogêneas de tumores de ovário.

Diversos miRNAs foram diferencialmente expressos entre o tecido normal e o adenocarcinoma seroso de alto grau. Aparentemente o perfil de expressão de miRNAs do tumor primário é semelhante ao perfil das amostras metastáticas.

Identificamos que o aumento da expressão do miRNA-503-5p foi encontrado em grupos de pacientes recidivadas em menor tempo após o término da quimioterapia. Entretanto, este miRNA foi encontrado diminuído na linhagem resistente a múltiplas drogas (HEYA8-MDR) em relação a sua linhagem parental sensível.

Dentre os miRNAs associados ao prognóstico das pacientes do nosso estudo, o hsa-miR-143-3p e o hsa-miR-934 foram também relacionados a pior sobrevida em pacientes do banco de dados do TCGA. Contudo, apenas o miR-934 foi validado em nossa casuística independente pela técnica de ISH.

O miRNA-934 parece ter um papel importante na progressão e no prognóstico de pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau, visto que este foi encontrado hiperexpresso em amostras tumorais e metastáticas em relação aos controles normais. Além da expressão nas células tumorais, a expressão do hsa-miR-934 foi identificada em fibroblastos.

Destaca-se neste estudo a importância de entendermos o papel dos miRNAs no microambiente tumoral. Esta compreensão é essencial para o desenvolvimento de futuras terapias relacionadas aos miRNAs.

O gene FZD3 foi predito como alvo de ambos miRNAs, hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p, a expressão gênica de FZD3 foi associada com melhor prognóstico em amostras do TCGA.

Todavia, a expressão proteica de FZD3 no citoplasma foi associada ao pior prognóstico em amostras da nossa casuística.

Não foi encontrada uma relação de FZD3 e de β -catenina neste estudo. Podemos sugerir que a expressão citoplasmática de FZD3 está associada a outras vias, como por exemplo a via não canônica de WNT, responsável por invasão e migração tumoral.

Neste trabalho, criamos um modelo hipotético para justificar a expressão de FZD3 no citoplasma e a regulação dos miRNAs sobre a expressão de FZD3. O hsa-miR-934 e hsa-miR-143-3p atuariam na redução da expressão do gene de FZD3 e outros mecanismos celulares podem convergir para a diminuição da expressão de FZD3 na membrana celular, como a sua degradação por enzimas ubiquitinas ligases. Sua internalização poderia ativar vias não canônicas de WNT.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Ovarian cancer**. Available from: <URL:http://www.cancer.org/> 2018 mai 12]

Allam H, Aoki K, Benigno BB, et al. Glycomic analysis of membrane glycoproteins with bisecting glycosylation from ovarian cancer tissues reveals novel structures and functions. **J Proteome Res** 2015; 14:434-46.

Almeida MI, Calin GA. The miR-143/miR-145 cluster and the tumor microenvironment: unexpected roles. **Genome Med** 2016; 8:1-3.

Amaral NS, Melo NC, Maia BM, et al. Noncoding RNA profiles in tobacco- and alcohol-associated diseases. **Genes** 2016; 8:6.

Ashikov A, Routier F, Fuhlrott J, et al. The human solute carrier gene SLC35B4 encodes a bifunctional nucleotide sugar transporter with specificity for UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine. **J Biol Chem** 2005; 280:27230-5.

Avilés EC, Wilson NH, Stoeckli ET. Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance. **Front Cell Neurosc** 2013; 7:86.

Bernardo AM, Thorsteinsdóttir S, Mummery CL. Advantages of the avian model for human ovarian cancer (Review). **Mol Clin Oncol** 2015; 3:1191-8.

Boone JD, Arend RC, Johnston BE, et al. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in primary ovarian cancer with the porcupine inhibitor WNT974. **Lab Invest** 2016; 96:249–59.

Cai J, Yang C, Yang Q, et al. Dereglulation of let-7e in epithelial ovarian cancer promotes the development of resistance to cisplatin. **Oncogenesis** 2013; 2:e75-e8.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:15524-9.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:2999-3004.

Calura E, Fruscio R, Paracchini L, et al. miRNA Landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities. **Clin Cancer Res** 2013; 19:4114-23.

Castilla MÁ, López-García MÁ, Atienza MR, et al. VGLL1 expression is associated with a triple-negative basal-like phenotype in breast cancer. **Endocr Relat Cancer** 2014; 21:587-99.

Chan JK, Brady MF, Penson RT, et al. Weekly vs. Every-3-week paclitaxel and carboplatin for ovarian cancer. **N Engl J Med** 2016; 374:738-48.

Chan KK-S, Lo RC. Deregulation of frizzled receptors in hepatocellular carcinoma. **Int J Mol Sci** 2018; 19:E313.

Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. **Int Immunopharmacol** 2014; 23:37-45.

Chen Y, Zhang L, Hao Q. Candidate microRNA biomarkers in human epithelial ovarian cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. **Cancer Cell Int** 2013; 13:86.

Cheng L, Wu S, Zhang K, Qing Y, Xu T. A comprehensive overview of exosomes in ovarian cancer: emerging biomarkers and therapeutic strategies. **J Ovarian Res** 2017; 10:73.

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.

Corda G, Sala A. Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. **Oncogenesis** 2017; 6:e364.

Damião RDS, Oshima CTF, Stávale JN, Stávale JN, Gonçalves WJ. Analysis of the expression of estrogen receptor, progesterone receptor and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I in ovarian epithelial cancers and normal ovaries. **Oncol Rep** 2007; 18:25-32.

Davidson B, Smith Y, Nesland JM, Kærn J, Reich R, Tropé CG. Defining a prognostic marker panel for patients with ovarian serous carcinoma effusion. **Hum Pathol** 2013; 44:2449-60.

Davidson B, Tropé CG. Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. **Womens Health (Lond.)** 2014; 10:519-33.

De Cecco L, Capaia M, Zupo S, et al. Interleukin 21 controls mRNA and MicroRNA expression in CD40-activated chronic lymphocytic leukemia cells. **PLoS One** 2015; 10: e0134706.

Dimitrova N, Gocheva V, Bhutkar A, et al. Stromal expression of miR-143/145 promotes neoangiogenesis in lung cancer development. **Cancer Discov** 2016; 6:188-201.

Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **J Mol Diagn** 2008; 10:203-11.

Du M, Shi D, Yuan L, et al. Circulating miR-497 and miR-663b in plasma are potential novel biomarkers for bladder cancer. **Sci Rep** 2015; 5:10437.

Eichelmann AK, Matuszcak C, Hummel R, Haier J. Role of miRNAs in cell signaling of cancer associated fibroblasts. **Int J Biochem Cell Biol** 2018; 101:94-102.

Eisenhauer EA. Real-world evidence in the treatment of ovarian cancer. **Ann Oncol** 2017; 28(suppl 8):viii61–viii65.

Engkvist ME, Stratford EW, Lorenz S, Meza-Zepeda LA, Myklebost O, Munthe E. Analysis of the miR-34 family functions in breast cancer reveals annotation error of miR-34b. **Sc Rep** 2017; 7:9655.

Erickson BK, Conner MG, Landen CNJ. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. **Am J Obstet Gynecol** 2013; 209:409-14.

Eskander RN, Kauderer J, Tewar KS, et al. Correlation between Surgeon's assessment and radiographic evaluation of residual disease in women with advanced stage ovarian cancer reported to have undergone optimal surgical cytoreduction: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2018; 6:525-30.

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

Faggad A, Budczies J, Tchernitsa O, et al. Prognostic significance of dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression. **J Pathol** 2010; 220:382-91.

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

Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, Boracchi P, Biganzoli EM, Panteghini M. Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. **J Clin Pathol** 2013; 66:273-81.

Ferreira PAR, Sallum LFTA, Sarian LS, Andrade LA, Derchain S. Carcinoma de ovário seroso e não seroso: tipo histológico em relação ao grau de diferenciação e prognóstico. **Rev Bras Ginecol Obstetr** 2012; 34:196-202.

Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. **Mol Cell Endocrinol** 2016; 247:4-21.

Foley OW, Rauh-Hain JA, del Carmen MG. Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment. **Oncology (Williston Park)** 2013; 27:288-94, 298.

Fuentes-Mattei, Giza, Shimizu. Plasma viral miRNAs indicate a high prevalence of occult viral infections. **EBioMedicine** 2017; 20:182-92.

Gomes SE, Pereira DM, Roma-rodrigues C, Fernandes AR, Borralho PM, Rodrigues CMP. Convergence of miR-143 overexpression, oxidative stress and cell death in HCT116 human colon cancer cells. **PLoS One** 2018; 13:e0191607.

Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line *BRCA* mutation. **Cancer Lett** 2015; 369:363-7.

Griffiths CT. Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. **Natl Cancer Inst Monogr** 1975; 42:101-4.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hansen C, Howlin J, Tengholm A, et al. Wnt-5a-induced phosphorylation of DARPP-32 inhibits breast cancer cell migration in a CREB-dependent manner. **J Biol Chem** 2009; 284:27533-43.

Hatakeyama J, Wald JH, Printsev I, Ho HY, Carraway KL 3rd. Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. **Endocr-Relat Cancer** 2014; 21:R345-56.

He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature** 2007; 447:1130-4.

He Z, Yi J, Liu X, et al. MiR-143-3p functions as a tumor suppressor by regulating cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting QKI-5 in esophageal squamous cell carcinoma. **Mol Cancer** 2016; 15:51.

Holmes D. Ovarian cancer: beyond resistance. **Nature** 2015; 527:S217.

Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. **Semin Surg Oncol** 2000; 19:3-10.

Huang RJ, Wong MK, Kuay KT, et al. An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). **Cell Death Dis** 2013; 4:e915.

Huang EY, Chang YJ, Huang SP, et al. A common regulatory variant in SLC35B4 influences the recurrence and survival of prostate cancer. **J Cell Mol Med** 2018; 22:3661-70.

Hwang CI, Matoso A, Corney DC, et al. Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:14240-5.

Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. **Cancer Res** 2007; 67:8699-707.

Jiang X, Charlat O, Zamponi R, Yang Y, Cong F. Dishevelled promotes wnt receptor degradation through recruitment of znrf3/rnf43 e3ubiquitin ligases. **Mol Cell** 2015; 58:522-33.

Jeong T-D, Cho E-J, Ko D-H. A new strategy for calculating the risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA). **Clin Chem Lab Med** 2017; 55:1209-14.

Johannessen C, Moi L, Kiselev Y, et al. Expression and function of the miR-143/145 cluster in vitro and in vivo in human breast cancer. **PLoS One** 2017; 12:e0186658.

Johansson K, Weidner J, Rådinger M. MicroRNAs in type 2 immunity. **Cancer Lett** 2018; 425:116-24.

Kanlikilicer P, Rashed MH, Bayraktar R, et al. Ubiquitous release of exosomal tumor suppressor miR-6126 from ovarian cancer cells. **Cancer Res** 2016; 76:7194-207.

Kent OA, McCall MN, Cornish TC, Halushka MK. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. **Nucleic Acids Res** 2014; 42:7528-38.

Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of MicroRNAs in ovarian cancer. **BioMed Res Int** 2014; 2014:249393.

Knepper TC, Saller J, Walko CM. Novel and expanded oncology drug approvals of 2016-PART 1: new options in solid tumor management. **Oncology** 2017; 31:110-21.

Kolbert CP, Feddersen RM, Rakhshan F, et al. Multi-platform analysis of microRNA expression measurements in RNA from fresh frozen and FFPE tissues. **PLoS One** 2013; 8:e52517.

Krivak TC, Lele S, Richard S, et al. A chemoresistance assay for prediction of platinum resistance in primary ovarian cancer. **Am J Obstet Gynecol** 2014; 211:68.e1-8.

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

Lausen B, Lerche R, Schumacher M. Maximally selected rank statistics for dose-response problems. **Biometrical J** 2002; 44:131-47.

Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 1993; 75:843-54.

Lei Miao, Qi Liu, C. Michael Lin, et al. Targeting tumor-associated fibroblasts for therapeutic delivery in desmoplastic tumors: in situ generation of tumor suppressive fibroblasts lei. **Cancer Res** 2016; 77:719-31.

Li Y, Yao L, Liu F, et al. Characterization of microRNA expression in serous ovarian carcinoma. **Int J Mol Med** 2014; 34:491-8.

Li Z, Wu1Q, Song1 J, Zhang Y, Zhu S, Sun S. Risk of second primary female genital malignancies in women with breast cancer: a SEER analysis Zhiyu. **Horm Cancer** 2018; 9:197-204.

Liu Y, Metzinger MN, Lewellen KA, et al. Obesity contributes to ovarian cancer metastatic success through increased lipogenesis, enhanced vascularity, and decreased infiltration of m1 macrophages. **Cancer Res** 2015; 75:5046-57.

Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R, et al. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. **Lancet Oncol** 2011; 12:273-85.

Medeiros F, Muto MG, Lee Y, et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:230-6.

Meinhold-Heerlein, Fotopoulou C, Harter P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. **Arch Gynecol Obstet** 2016; 293:1367.

Meghani K, Fuchs W, Detappe A, et al. Multifaceted impact of MicroRNA 493-5p on genome-stabilizing pathways induces platinum and PARP inhibitor resistance in BRCA2-mutated carcinomas. **Cell Rep** 2018; 23:100-11.

Mezencev R, Wartell RM. Cisplatin binds to pre-miR-200b and impairs its processing to mature microRNA. **Neoplasia** 2018; 65:222-7.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Montcouquiol M, Sans N, Huss D. Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. **J Neurosci** 2006; 26:5265-75.

Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Oncol** 2013; 31:4188-98.

Moreno-Smith, Halder, Meltzer, et al. ATP11B mediates platinum resistance in ovarian cancer. **J Clin Invest** 2013; 123:2119-30.

Muñoz-Rodríguez JL, Vrba L, Futscher BW, et al. Differentially expressed MicroRNAs in postpartum breast cancer in Hispanic women. **PLoS One** 2015; 10:e0124340.

Musella A, Bardhi E, Marchetti, et al. Rucaparib: An emerging PARP inhibitor for treatment of recurrent ovarian cancer. **Cancer Treat** 2018; 66:7-14.

Nagy B, Tóth L, Molnár P, et al. Nuclear β -catenin positivity as a predictive marker of long-term survival in advanced epithelial ovarian cancer. **Pathol Res Pract** 2017; 213:915-21.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. 2010. **Epithelial ovarian cancer (including fallopian tube cancer and primary peritoneal cancer)**. Available from: <URL:<http://www.nccn.org/>> [2018 mai 12]

[OCRFA] Ovarial Cancer Research Fund Alliance. **Statistics**. Available from: <URL:<https://ocrfa.org/patients/about-ovarian-cancer/statistics/>> [2018 mar 3].

Pandya D, Mariani M, McHugh M, et al. Herpes virus MicroRNA expression and significance in serous ovarian cancer. **PLoS One** 2014; 9:e114750.

Park YT, Jeong J, Lee M, et al. MicroRNAs overexpressed in ovarian ALDH1-positive cells are associated with chemoresistance. **J Ovarian Res** 2013; 6:18.

Pellatt DF, Stevens JR, Wolff RK, et al. Expression profiles of miRNA subsets distinguish human colorectal carcinoma and normal colonic mucosa. **Clin Transl Gastroenterol** 2016; 7:e152.

Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:699-708.

Piek JMJ, Kenemans P, Verheijen RHM. Intraperitoneal serous adenocarcinoma: a critical appraisal of three hypotheses on its cause. **Am J Obstetr Gynecol** 2004; 191:718-32.

Plaisier CL, Pan M, Baliga NS. A miRNA-regulatory network explains how dysregulated miRNAs perturb oncogenic processes across diverse cancers. **Genome Res** 2012; 22:2302-14.

Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. **EMBO J** 2012; 31:2737-46.

Prahm KP, Novotny GW, Høgdall C, Høgdall E. Current status on microRNAs as biomarkers for ovarian cancer. **APMIS** 2016; 124:337-55.

Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. **Ann Oncol** 2012; 23(suppl 10):x111-x7.

Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. **Int J Gynaecol Obstet** 2014; 124:1-5.

Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. **J Gynecol Oncol** 2015; 26:87-9.

Qin M, Jin Y, Ma L, Zhang YY, Pan LY. The role of neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and observational studies. **Oncotarget** 2018; 9:8614-28.

Ramus SJ, Antoniou AC, Kuchenbaecker KB. Ovarian cancer susceptibility alleles and risk of ovarian cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Hum Mutat** 2012; 33:690-702.

Saad MA, Kuo SZ, Rahimy E, et al. Alcohol-dysregulated miR-30a and miR-934 in head and neck squamous cell carcinoma. **Mol Cancer** 2015; 14:181.

Salehi F, Dunfield L, Phillips KP, Krewski D, Vanderhyden BC. Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev** 2008; 11:301-21.

Schneider-Yin X, van Tuyll van Serooskerken AM, Siegesmund M, et al. Biallelic inactivation of protoporphyrinogen oxidase and hydroxymethylbilane synthase is associated with liver cancer in acute porphyrias. **J Hepatol** 2015; 62:734-8.

Seagle B-LL, Dandapani M, Yeh JY, Shahabi S. Wnt signaling and survival of women with high-grade serous ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2016; 26:1078-80.

Shafer B, Onishi K, Lo C. Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance. **Dev Cell** 2011; 20:177-91.

Shi H, Shen H, Xu J, Zhao S, Yao S, Jiang N. MiR-143-3p suppresses the progression of ovarian cancer. **Am J Transl Res** 2018; 10:866-74.

Shu Y, Ye W, Gu YL. Blockade of miR-663b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in osteosarcoma via regulating TP73 expression. **Bratisl Lek Listy** 2018; 119:41-6.

Slattery ML, Mullany LE, Sakoda LC, Wolff RK, Samowitz WS, Herrick JS. Dysregulated genes and miRNAs in the apoptosis pathway in colorectal cancer patients. **Apoptosis** 2018; 23:237-50.

Skirnisdottir I, Seidal T. Association of p21, p21 p27 and p21 p53 status to histological subtypes and prognosis in low-stage epithelial ovarian cancer. **Cancer Genomics Proteomic** 2013; 10:27-34.

Sky T, Asc M, Ym EF. β -catenin downregulates Dicer to promote ovarian cancer metastasis. **Oncogene** 2017; 36:5927-38.

Sun X, Dai G, Yu L, Hu Q, Chen J, Guo W. miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2. **Sci Rep** 2018; 8:606.

Tapper J, Kettunen E, El-Rifai W, Seppälä M, Andersson LC, Knuutila S. Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 128:1-6.

Tewari D, Java JJ, Salani R, et al. Long-term survival advantage and prognostic factors associated with intraperitoneal chemotherapy treatment in advanced ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. **J Clin Oncol** 2015; 33:1460-6.

Tone AA, Begley H, Sharma M, et al. Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. **Clin Cancer** 2008; 14:4067-78.

Tuna M, Machado AS, Calin GA. Genetic and epigenetic alterations of MicroRNAs and implications for human cancers and other diseases. **Genes Chromosomes Cancer** 2016; 55:193-214.

van Gorp T, Cadron I, Despierre E, et al. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the risk of ovarian malignancy algorithm. **Br J Cancer** 2011; 104:863-70.

van Zandwijk N, Pavlakis N, Kao, et al. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. **Lancet Oncol** 2017; 18:1386-96.

Vaughan S, Coward JI, Bast RC, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nat Rev Cancer** 2012; 11:719-25.

Wang L, He J, Xu H, Xu L, Li N. MiR-143 targets CTGF and exerts tumor-suppressing functions in epithelial ovarian cancer. **Am J Transl Res** 2016; 8:2716-26.

Wang P, Guo J, Wang F, Shi T, Ma D. Human SBK1 is dysregulated in multiple cancers and promotes survival of ovary cancer SK-OV-3 cells. **Mol Biol Rep** 2011; 38:3551-9.

Wang X, Zhao X, Wang K, Wu L, Duan T. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. **Cancer Sci** 2013; 104:516-23.

Wong SCC, He CW, Chan CML, et al. Clinical significance of frizzled homolog 3 protein in colorectal cancer patients. **PLoS One** 2013; 8:e79481.

Wee I, Syn N, Sethi G, Goh BC, Wang L. Role of tumor-derived exosomes in cancer metastasis. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer** 2019; 1871:12-19.

Wu H, Gao Y, Ding L, He D, Li Y. Gene expression profile analysis of SUDHL6 cells with siRNA-mediated BCL11A downregulation. **Cell Biol Int** 2014; 38:1205-14.

Wu D, Lu P, Mi X, Miao J. Downregulation of miR-503 contributes to the development of drug resistance in ovarian cancer by targeting PI3K p85. **Arch Gynecol Obstet** 2018; 297:699-707.

Xu L, Cai J, Yang Q, et al. Prognostic significance of several biomarkers in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of published studies. **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 139:1257-77.

Yu PN, Yan MD, Lai HC, et al. Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. **Int J Cancer** 2013; 134:542-51.

Zaman MS, Maher DM, Khan S, Jaggi M, Chauhan SC. Current status and implications of microRNAs in ovarian cancer diagnosis and therapy. **J Ovarian Res** 2012; 5:44.

Zhang X, Chen J, Radcliffe T, Lebrun DP, Tron VA, Feilotter H. An array-based analysis of microRNA expression comparing matched frozen and formalin-fixed paraffin-embedded human tissue samples. **J Mol Diagn** 2008; 10:513-9.

Zhang Y, Tang H, Cai J, et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. **Cancer Lett** 2011; 303:47-55.

Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q, Lv K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. **Int J Mol Med** 2013; 31:797-802.

Zhou J, Gong G, Tan H, et al. Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma. **Oncol Rep** 2015; 33:2915-23.

Zhu H-T, Dong Q-Z, Sheng Y-Y, et al. MicroRNA-29a-5p Is a Novel Predictor for Early Recurrence of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma after Surgical Resection. **PLoS One** 2012; 7:e52393.

Zhu M-Y, Zhang W, Yang T. Diverse microRNAs with convergent functions regulate tumorigenesis. **Oncol Lett** 2016; 11:915-20.

Zivanovic O, Eisenhauer EL, Zhou Q, et al. The impact of bulky upper abdominal disease cephalad to the greater omentum on surgical outcome for stage IIIC epithelial ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. **Gynecol Oncol** 2008; 108:287-92.

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, 09 de junho de 2014.

**Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha.**

Aluna: Nayra Soares do Amaral (Doutorado).

**Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1873/14
“Identificação de miRNAs diferencialmente expressos em carcinomas serosos de alto grau de pacientes com distintas evoluções clínicas”.**

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 29/04/2014, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/03/2014, **aprovaram** a realização do projeto 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 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

Apêndice 1 - Tabela Suplementar 1 - Comparação entre controle normal e adenocarcinoma seroso de alto grau primário

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-34b-5p	< 1e-07	< 1e-07	2860,4	29,02	-98,6
hsa-miR-144-3p	3,00E-07	1,05E-05	489,1	11,67	-41,9
hsa-miR-451a	1,20E-06	2,44E-05	25531,67	656,2	-38,9
hsa-miR-143-3p	2,00E-07	7,95E-06	1738,95	55,39	-31,4
hsa-miR-145-5p	< 1e-07	< 1e-07	4045,21	135,64	-29,8
hsa-miR-424-5p	2,00E-07	7,95E-06	2990,15	103,82	-28,8
hsa-miR-145-3p	5,00E-07	1,29E-05	198,64	7,47	-26,6
hsa-miR-126-3p	< 1e-07	< 1e-07	4783,99	257,21	-18,6
hsa-miR-140-3p	< 1e-07	< 1e-07	744,43	41,82	-17,8
hsa-miR-10a-5p	0,0002014	0,000967	1565,06	118,77	-13,2
hsa-miR-140-5p	4,00E-07	1,13E-05	294,07	23,69	-12,4
hsa-miR-195-5p	7,40E-06	8,86E-05	3112,81	253,11	-12,3
hsa-miR-133b	0,005221	0,0123	113,46	9,56	-11,9
hsa-miR-100-5p	8,00E-07	1,66E-05	2789,9	245,91	-11,4
hsa-miR-450a-5p	1,05E-05	0,000113	110,51	10,29	-10,7
hsa-miR-497-5p	5,52E-05	0,000363	807,88	79,19	-10,2
hsa-miR-126-5p	< 1e-07	< 1e-07	105,71	10,62	-10,0
hsa-miR-4324	< 1e-07	< 1e-07	321,35	33,68	-9,5
hsa-miR-150-5p	0,0001456	0,00074	340,62	37,56	-9,1
hsa-miR-199b-5p	1,18E-05	0,000118	394,53	43,83	-9,0
hsa-miR-125b-5p	7,00E-07	1,57E-05	9358,1	1044,65	-9,0
hsa-miR-218-5p	1,80E-06	3,42E-05	182,53	21,39	-8,5
hsa-miR-23b-3p	4,00E-07	1,13E-05	4823,95	576,35	-8,4
hsa-miR-486-5p	< 1e-07	< 1e-07	308,26	36,98	-8,3
hsa-miR-99a-5p	2,40E-06	4,03E-05	3406,32	409,81	-8,3
hsa-miR-29c-3p	6,56E-05	0,000412	3087,02	375,12	-8,2
hsa-miR-223-3p	0,0012267	0,00388	784,7	98,61	-8,0
hsa-miR-101-3p	0,0001995	0,000963	376,37	47,98	-7,8
hsa-miR-503-5p	7,22E-05	0,000446	104,84	13,76	-7,6
hsa-miR-139-5p	2,80E-06	4,22E-05	72,5	9,98	-7,3
hsa-miR-455-3p	7,30E-05	0,000446	114,09	15,85	-7,2
hsa-miR-29c-5p	2,60E-06	4,13E-05	103,11	14,47	-7,1
hsa-miR-26b-5p	8,05E-05	0,000475	4408,28	624,78	-7,1
hsa-miR-27b-3p	1,08E-05	0,000115	3610,54	534,78	-6,8
hsa-miR-204-5p	5,00E-07	1,29E-05	105,71	15,85	-6,7
hsa-miR-361-3p	2,09E-05	0,000165	141,24	21,55	-6,6
hsa-miR-10b-5p	0,0023388	0,00641	3002,61	461,06	-6,5
hsa-miR-455-5p	2,26E-05	0,000175	52,35	8,19	-6,4
hsa-miR-22-3p	0,0002793	0,00122	1179,53	185,13	-6,4
hsa-miR-152-3p	8,30E-06	9,41E-05	180,52	28,9	-6,3
hsa-miR-29a-3p	0,0003349	0,0014	5389,74	875,77	-6,2
hsa-miR-449a	0,0252841	0,045	218,88	35,66	-6,1
hsa-miR-338-3p	0,0008163	0,00287	116,97	19,14	-6,1

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-31-5p	0,0080124	0,0176	129,25	21,42	-6,0
hsa-miR-148a-3p	0,0017262	0,00497	974,15	162,24	-6,0
hsa-miR-374b-5p	9,29E-05	0,000538	290,82	49,38	-5,9
hsa-miR-3653-3p	2,00E-07	7,95E-06	181,27	30,84	-5,9
hsa-miR-30a-5p	0,0001048	0,000595	729,11	125,82	-5,8
hsa-miR-28-5p	0,0001108	0,00062	172,21	29,77	-5,8
hsa-miR-374a-5p	0,0003207	0,00137	350,68	61,55	-5,7
hsa-miR-29b-3p	0,0030898	0,00787	1792,8	315,35	-5,7
hsa-miR-135a-5p	6,10E-06	7,73E-05	55,1	9,71	-5,7
hsa-miR-26a-5p	0,0001184	0,000647	4764,14	840,09	-5,7
hsa-miR-30a-3p	3,00E-07	1,05E-05	122,45	21,74	-5,6
hsa-miR-142-3p	0,0035401	0,00872	292,44	52,2	-5,6
hsa-miR-3607-3p	6,40E-06	7,99E-05	54,87	9,94	-5,5
hsa-miR-185-5p	5,62E-05	0,000366	149,5	27,97	-5,4
hsa-miR-30b-5p	0,0010895	0,0036	1236,46	230,98	-5,4
hsa-miR-885-5p	0,0005534	0,00208	57,2	10,74	-5,3
hsa-miR-342-3p	0,0007894	0,00278	436,55	82,39	-5,3
hsa-miR-576-5p	0,001127	0,00366	16,73	3,22	-5,2
hsa-miR-95-3p	0,0014401	0,00437	64	12,39	-5,2
hsa-miR-133a-3p	0,0009983	0,00338	56,57	11,01	-5,1
hsa-miR-132-3p	1,12E-05	0,000117	77,49	15,35	-5,1
hsa-miR-199a-5p	0,0011578	0,00371	789,06	157,94	-5,0
hsa-miR-16-5p	0,000495	0,00188	7141,44	1437,35	-5,0
hsa-miR-15a-5p	0,0019979	0,0056	684,07	139,06	-4,9
hsa-miR-196b-5p	0,0004422	0,00176	78,25	16,24	-4,8
hsa-miR-30c-5p	0,0002708	0,0012	501,46	104,92	-4,8
hsa-miR-34a-5p	0,0005539	0,00208	1049,87	222,31	-4,7
hsa-let-7c-5p	1,32E-05	0,000125	7111,81	1537,1	-4,6
hsa-let-7g-5p	0,0011339	0,00366	4945,84	1073,72	-4,6
hsa-miR-30e-3p	0,0001167	0,000646	94,62	20,55	-4,6
hsa-miR-1260b	0,0019347	0,00545	590,58	130,87	-4,5
hsa-miR-214-3p	0,0001344	0,000702	331,76	74,52	-4,5
hsa-miR-194-5p	0,0049812	0,0117	75,27	17,5	-4,3
hsa-miR-1271-5p	< 1e-07	< 1e-07	38,85	9,21	-4,2
hsa-miR-148b-3p	0,003416	0,00848	148,06	35,44	-4,2
hsa-miR-186-5p	0,0005209	0,00197	64,18	15,52	-4,1
hsa-miR-34c-3p	0,0008582	0,00298	89,14	21,75	-4,1
hsa-miR-199a-3p	0,0033995	0,00846	2778,33	686,54	-4,1
hsa-miR-769-5p	4,64E-05	0,000312	37,12	9,39	-4,0
hsa-miR-505-3p	0,0001348	0,000702	52,06	13,25	-3,9
hsa-miR-331-3p	0,0016706	0,00488	264,29	68,04	-3,9
hsa-miR-1260a	0,0079922	0,0176	857,5	221,01	-3,9
hsa-miR-340-5p	0,0030989	0,00787	63,12	16,33	-3,9
hsa-miR-542-3p	3,79E-05	0,000274	96,47	25,48	-3,8
hsa-miR-24-3p	0,0002194	0,00101	2912,41	776,05	-3,8
hsa-miR-361-5p	0,0002378	0,00109	399,49	108,14	-3,7
hsa-miR-7-1-3p	0,0174008	0,0324	19,05	5,19	-3,7
hsa-let-7a-5p	0,000649	0,00234	17559,94	4813,26	-3,7

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-let-7b-5p	0,0002039	0,000974	11812,28	3241,4	-3,6
hsa-miR-340-3p	0,0144216	0,0279	19,64	5,5	-3,6
hsa-miR-365a-3p	0,0025216	0,00682	256	72,04	-3,6
hsa-miR-221-5p	0,0001431	0,000731	36,2	10,27	-3,5
hsa-miR-454-3p	0,000462	0,00178	65,62	18,78	-3,5
hsa-let-7f-5p	0,0014529	0,00439	11894,44	3409,16	-3,5
hsa-miR-181c-5p	0,0029765	0,00763	53,97	15,45	-3,5
hsa-miR-99b-5p	0,0025985	0,00695	187,92	53,97	-3,5
hsa-miR-299-5p	0,0264984	0,0468	40,39	11,6	-3,5
hsa-miR-15b-5p	0,0025496	0,00687	1288,97	375,12	-3,4
hsa-miR-181a-5p	0,0046041	0,011	522,03	154,77	-3,4
hsa-miR-342-5p	0,0006593	0,00237	45,63	13,86	-3,3
hsa-miR-23a-3p	0,0032828	0,00827	2743,88	836,6	-3,3
hsa-miR-125a-5p	0,0060315	0,0138	444,49	136,69	-3,3
hsa-miR-362-3p	0,0091001	0,0195	58,08	17,87	-3,3
hsa-miR-16-2-3p	0,0013951	0,00429	48,3	14,92	-3,2
hsa-miR-151a-5p	0,0065838	0,0149	669,06	208,05	-3,2
hsa-miR-532-3p	0,0091983	0,0196	65,16	20,26	-3,2
hsa-miR-664b-3p	0,0006703	0,00238	98,22	30,99	-3,2
hsa-miR-335-5p	0,0272441	0,0479	180,77	57,09	-3,2
hsa-miR-30e-5p	0,0119252	0,0239	393,44	125,57	-3,1
hsa-miR-154-5p	0,0128757	0,0255	39,23	12,59	-3,1
hsa-miR-548n	0,0029628	0,00763	21,26	6,88	-3,1
hsa-miR-23b-5p	2,02E-05	0,000162	29,41	9,68	-3,0
hsa-miR-628-5p	4,45E-05	0,000304	21,35	7,04	-3,0
hsa-miR-320d	0,0003384	0,0014	589,77	195,85	-3,0
hsa-miR-3145-3p	7,68E-05	0,000463	19,27	6,52	-3,0
hsa-miR-192-5p	0,0075748	0,0168	62,34	21,14	-3,0
hsa-miR-664a-3p	1,47E-05	0,000134	36,05	12,31	-2,9
hsa-miR-629-5p	0,0091245	0,0195	20,51	7,16	-2,9
hsa-miR-27a-3p	0,0113796	0,0231	1160,07	414,49	-2,8
hsa-let-7e-5p	0,003398	0,00846	1609,06	578,59	-2,8
hsa-miR-151b	0,0065704	0,0149	304,02	109,99	-2,8
hsa-miR-30d-5p	0,0149198	0,0287	418,19	151,5	-2,8
hsa-let-7i-5p	0,0202836	0,0371	2706,1	985,83	-2,7
hsa-miR-378d	0,0152942	0,0294	72,91	26,7	-2,7
hsa-miR-221-3p	0,0276815	0,0484	259,57	94,98	-2,7
hsa-miR-502-5p	0,0034972	0,00863	26,5	9,89	-2,7
hsa-miR-320e	0,0001964	0,000954	432,93	162,51	-2,7
hsa-let-7d-5p	0,0043113	0,0104	1689,05	636,32	-2,7
hsa-miR-548ay-5p	0,0010906	0,0036	14,99	5,71	-2,6
hsa-miR-28-3p	0,0003606	0,00147	32	12,22	-2,6
hsa-miR-107	0,0166769	0,0314	1347,44	514,99	-2,6
hsa-miR-484	0,0045549	0,0109	38,8	14,89	-2,6
hsa-miR-195-3p	0,0012055	0,00383	24,73	9,5	-2,6
hsa-miR-652-3p	0,0188272	0,0347	62,25	23,93	-2,6
hsa-miR-502-3p	0,0012777	0,00403	47,18	18,32	-2,6
hsa-miR-548d-5p	0,0016422	0,00485	23,2	9	-2,6
hsa-miR-98-5p	0,0216901	0,0394	234,27	91,01	-2,6

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-574-3p	0,0053938	0,0126	227,23	88,7	-2,6
hsa-miR-193a-3p	0,0153985	0,0294	129,97	50,82	-2,6
hsa-miR-222-3p	0,0233131	0,0419	200,02	78,21	-2,6
hsa-miR-590-5p	0,0006463	0,00234	78,14	30,73	-2,5
hsa-miR-548am-5p	0,0016555	0,00486	23,36	9,45	-2,5
hsa-miR-29a-5p	0,0014933	0,00447	14,24	5,89	-2,4
hsa-miR-4317	0,0014999	0,00447	32,85	13,58	-2,4
hsa-miR-320b	0,0001494	0,00075	565,74	235,89	-2,4
hsa-miR-4291	0,0003335	0,0014	170,54	72,34	-2,4
hsa-miR-4760-3p	0,0166451	0,0314	16,16	6,92	-2,3
hsa-miR-505-5p	0,0013312	0,00416	21,56	9,44	-2,3
hsa-miR-125b-2-3p	4,40E-06	6,10E-05	55,1	24,4	-2,3
hsa-miR-4306	7,25E-05	0,000446	287,22	129,43	-2,2
hsa-miR-335-3p	0,0006669	0,00238	18,79	8,68	-2,2
hsa-miR-548aa	0,0015164	0,00451	20,39	9,85	-2,1
hsa-miR-4261	0,0060985	0,0139	238,2	114,95	-2,1
hsa-miR-212-3p	0,0084613	0,0184	160,23	77,56	-2,1
hsa-miR-4652-3p	0,0057714	0,0134	14,01	6,92	-2,0
hsa-miR-4664-3p	1,10E-05	0,000116	12,55	25,81	2,0
hsa-miR-5008-5p	0,0001518	0,000758	53,89	109,65	2,0
hsa-miR-4268	0,0002679	0,0012	11,11	22,8	2,0
hsa-miR-373-3p	0,0016954	0,00492	5,64	11,4	2,0
hsa-miR-3917	0,0057119	0,0133	82,48	166,8	2,0
hsa-miR-596	0,0064348	0,0146	10,43	21,37	2,0
hsa-miR-4530	0,0089404	0,0192	3712,05	7613,8	2,0
hsa-miR-642b-3p	0,0102019	0,0212	405,62	822,8	2,0
hsa-miR-3180-3p	0,0128823	0,0255	9,08	18,41	2,0
hsa-miR-298	0,0136383	0,0267	25,74	52,71	2,0
hsa-miR-4478	0,0210014	0,0382	373,25	767,49	2,0
hsa-miR-5587-5p	0,0274732	0,0481	6,3	12,83	2,0
hsa-miR-3161	1,50E-05	0,000135	18,33	38,33	2,1
hsa-miR-4419b	7,57E-05	0,000459	26,98	56,68	2,1
hsa-miR-4417	0,0002395	0,00109	160,45	337,7	2,1
hsa-miR-3141	0,001102	0,00362	250,73	526,54	2,1
hsa-miR-3197	0,0012874	0,00405	40,9	84,54	2,1
hsa-miR-4669	0,0018594	0,00529	310,4	646,63	2,1
hsa-miR-4739	0,002654	0,00707	662,6	1369,28	2,1
hsa-miR-3652	0,0043629	0,0105	241,52	505,51	2,1
hsa-miR-4653-3p	0,0133231	0,0263	509,17	1066,6	2,1
hsa-miR-4673	0,0164954	0,0312	81,35	170,45	2,1
hsa-miR-4516	5,90E-06	7,58E-05	7121,67	15308,02	2,1
hsa-miR-4687-3p	1,68E-05	0,000141	1136,2	2436,17	2,1
hsa-miR-4749-5p	4,26E-05	0,000293	14,28	30,15	2,1
hsa-miR-760	0,0001333	0,000702	32,09	68,86	2,1
hsa-miR-345-3p	0,0004229	0,00169	38,37	81,78	2,1
hsa-miR-514b-5p	0,0010807	0,00359	40,28	86,41	2,1
hsa-miR-4257	0,0017732	0,00508	141,24	299,25	2,1
hsa-miR-4700-5p	0,0092616	0,0196	5,74	12,32	2,1
hsa-miR-4721	0,0118034	0,0237	1009,9	2162,97	2,1

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-3960	9,57E-05	0,00055	2418,67	5223,5	2,2
hsa-miR-1273f	0,0002397	0,00109	144,61	315,96	2,2
hsa-miR-6724-5p	0,0003356	0,0014	810,12	1759,81	2,2
hsa-miR-4535	0,0003501	0,00144	46,33	100,71	2,2
hsa-miR-4745-5p	0,000637	0,00233	167,5	366,89	2,2
hsa-miR-4298	0,0010591	0,00353	197,54	425,32	2,2
hsa-miR-4743-5p	0,0014922	0,00447	55,48	121,6	2,2
hsa-miR-1291	0,0032246	0,00817	10,06	21,84	2,2
hsa-miR-4466	2,40E-06	4,03E-05	905,14	2008,64	2,2
hsa-miR-4688	9,20E-06	0,000102	30,36	67,13	2,2
hsa-miR-3147	4,07E-05	0,000292	24,8	55,53	2,2
hsa-miR-4709-3p	0,0001637	0,000813	6,56	14,73	2,2
hsa-miR-4788	0,0003355	0,0014	445,72	1000,15	2,2
hsa-miR-6075	0,000853	0,00297	136,62	302,59	2,2
hsa-miR-5585-3p	0,0011135	0,00364	164,51	365,27	2,2
hsa-miR-4665-5p	0,0015514	0,0046	24,18	53,21	2,2
hsa-miR-4465	0,0068318	0,0153	378,46	836,37	2,2
hsa-miR-3622a-5p	0,0091838	0,0196	16,8	37,7	2,2
hsa-miR-498	3,14E-05	0,000233	18,25	41,74	2,3
hsa-miR-493-3p	8,51E-05	0,000496	8,07	18,25	2,3
hsa-miR-6509-5p	0,0001347	0,000702	12,3	27,91	2,3
hsa-miR-4701-3p	0,0001486	0,00075	60,63	137,61	2,3
hsa-miR-1287-5p	0,0008281	0,0029	35,75	81,23	2,3
hsa-miR-3155b	0,0010029	0,00338	8,79	20,07	2,3
hsa-miR-711	0,0011182	0,00365	19,45	44,01	2,3
hsa-miR-4441	0,0068526	0,0154	15,33	34,77	2,3
hsa-miR-4421	0,0254444	0,0452	4,18	9,44	2,3
hsa-miR-610	5,00E-07	1,29E-05	21,2	48,76	2,3
hsa-miR-4311	3,80E-06	5,54E-05	6,87	16	2,3
hsa-miR-99b-3p	5,05E-05	0,000334	49,8	115,78	2,3
hsa-miR-623	7,84E-05	0,000469	31,91	73,8	2,3
hsa-miR-5090	0,0002188	0,00101	23,39	53,79	2,3
hsa-miR-4710	0,0002805	0,00122	38,16	89,71	2,3
hsa-miR-4655-5p	0,0003552	0,00145	21,89	51,33	2,3
hsa-miR-574-5p	0,0013651	0,00425	284,84	667,03	2,3
hsa-miR-2392	0,0013721	0,00425	124,33	286,18	2,3
hsa-miR-4726-5p	0,0013829	0,00427	24,15	55,65	2,3
hsa-miR-4448	0,0024965	0,00678	14,52	33,69	2,3
hsa-miR-4505	0,0027265	0,0072	2025,41	4710,29	2,3
hsa-miR-3925-5p	0,0135042	0,0265	19,13	44,16	2,3
hsa-miR-939-5p	4,00E-07	1,13E-05	541,94	1297,57	2,4
hsa-miR-1915-3p	2,70E-06	4,21E-05	800,08	1884,54	2,4
hsa-miR-5001-5p	7,40E-06	8,86E-05	563,39	1342,96	2,4
hsa-miR-3680-3p	1,14E-05	0,000117	7,26	17,36	2,4
hsa-miR-1229-5p	1,19E-05	0,000118	485,05	1159,75	2,4
hsa-miR-1207-5p	1,66E-05	0,000141	1760,78	4206,49	2,4
hsa-miR-3937	4,16E-05	0,000292	70,23	167,08	2,4
hsa-miR-4792	4,25E-05	0,000293	15,37	36,85	2,4
hsa-miR-5003-3p	4,59E-05	0,000311	23,85	56,81	2,4

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-150-3p	0,000128	0,000686	132,33	311,87	2,4
hsa-miR-4758-5p	0,0001353	0,000702	70,33	166,66	2,4
hsa-miR-4632-5p	0,0009126	0,00314	86,34	203,43	2,4
hsa-miR-513b-5p	0,0027855	0,00729	256,36	616,86	2,4
hsa-miR-4695-5p	0,0033721	0,00844	142,22	339,3	2,4
hsa-miR-3130-3p	0,0078893	0,0175	4,33	10,35	2,4
hsa-miR-5006-5p	0,0128199	0,0255	620,81	1470,41	2,4
hsa-miR-5195-3p	2,80E-06	4,22E-05	78,03	189,6	2,4
hsa-miR-4270	1,56E-05	0,000136	322,69	781,01	2,4
hsa-miR-4447	2,23E-05	0,000174	8,63	21,22	2,4
hsa-miR-3188	5,65E-05	0,000366	101,41	245,78	2,4
hsa-miR-134-5p	6,08E-05	0,000388	289,62	699,41	2,4
hsa-miR-1182	6,35E-05	0,000402	18,23	44,81	2,4
hsa-miR-6133	0,0001759	0,000859	10,32	25,02	2,4
hsa-miR-1321	0,0002426	0,0011	7,33	17,84	2,4
hsa-miR-525-5p	0,000326	0,00138	5,27	12,8	2,4
hsa-miR-4732-5p	0,0014038	0,0043	21,86	52,78	2,4
hsa-miR-490-5p	0,0037739	0,00921	16,89	40,92	2,4
hsa-miR-6087	5,90E-06	7,58E-05	5177,36	13008,8	2,5
hsa-miR-614	9,70E-06	0,000106	21,44	54,12	2,5
hsa-miR-1225-5p	8,46E-05	0,000496	1992	5005,16	2,5
hsa-miR-3621	0,0001114	0,00062	15,26	38,45	2,5
hsa-miR-1307-3p	0,0001657	0,000818	10,75	26,83	2,5
hsa-miR-1273g-5p	0,0004496	0,00177	6,22	15,7	2,5
hsa-miR-6716-5p	0,0010219	0,00344	14,48	36,44	2,5
hsa-miR-671-5p	0,0016556	0,00486	155,63	391,37	2,5
hsa-miR-513c-5p	0,0017276	0,00497	159,79	397,5	2,5
hsa-miR-4507	0,0017915	0,00512	1353,05	3352,91	2,5
hsa-miR-4656	0,0019153	0,00542	229,44	574,28	2,5
hsa-miR-3137	0,0033321	0,00837	186,63	469,96	2,5
hsa-miR-4498	0,0137907	0,0269	20,22	50,55	2,5
hsa-miR-4787-5p	2,34E-05	0,000179	451,32	1161,36	2,6
hsa-miR-4748	0,0001177	0,000647	5,49	14,12	2,6
hsa-miR-3620-5p	0,0003165	0,00136	72,5	187,77	2,6
hsa-miR-4689	0,0004145	0,00166	84,57	217,01	2,6
hsa-miR-4690-5p	0,0005999	0,00222	66,81	171,92	2,6
hsa-miR-4783-3p	0,0021845	0,00605	10,53	26,93	2,6
hsa-miR-373-5p	8,00E-07	1,66E-05	23,04	59,91	2,6
hsa-miR-6074	7,70E-06	9,09E-05	19,64	51,34	2,6
hsa-miR-4327	1,26E-05	0,000123	113,3	295,37	2,6
hsa-miR-3194-5p	1,68E-05	0,000141	48,1	126,34	2,6
hsa-miR-194-3p	3,07E-05	0,000231	9,42	24,73	2,6
hsa-miR-3972	0,0114548	0,0232	4,05	10,79	2,6
hsa-miR-3665	< 1e-07	< 1e-07	1391,09	3675,18	2,6
hsa-miR-6125	1,40E-05	0,000132	1233,04	3323,3	2,7
hsa-miR-4271	1,71E-05	0,000142	172,92	471,4	2,7
hsa-miR-6076	1,88E-05	0,000154	417,03	1135,88	2,7
hsa-miR-3196	1,91E-05	0,000155	541,94	1445,75	2,7
hsa-miR-659-3p	3,01E-05	0,000229	12,33	33,36	2,7

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-4741	4,18E-05	0,000292	302,75	826	2,7
hsa-miR-4451	0,000106	0,000598	14,12	38,42	2,7
hsa-miR-1236-5p	0,0002095	0,00099	126,76	346,04	2,7
hsa-miR-4314	0,0004496	0,00177	54,42	148,51	2,7
hsa-miR-513a-5p	0,0004548	0,00178	276,67	752,32	2,7
hsa-miR-3682-3p	0,0016939	0,00492	65,53	177,15	2,7
hsa-miR-3182	0,015684	0,0298	6,48	17,59	2,7
hsa-miR-4281	2,00E-07	7,95E-06	2553,04	7191,12	2,8
hsa-miR-4443	4,00E-07	1,13E-05	1787,84	4937,62	2,8
hsa-miR-708-5p	4,10E-06	5,78E-05	11,71	32,18	2,8
hsa-miR-6511a-5p	1,44E-05	0,000134	19,03	53,21	2,8
hsa-miR-4260	0,0001225	0,000661	8,55	23,75	2,8
hsa-miR-1185-2-3p	0,0001365	0,000702	81,91	224,66	2,8
hsa-miR-3150b-3p	0,0002191	0,00101	13,42	37,04	2,8
hsa-miR-6718-5p	0,0002508	0,00113	6,98	19,2	2,8
hsa-miR-197-5p	0,0004711	0,0018	2126,11	5948,87	2,8
hsa-miR-6132	0,002958	0,00763	665,36	1869,97	2,8
hsa-miR-4430	0,0099669	0,0208	237,87	668,51	2,8
hsa-miR-3189-5p	0,0169615	0,0317	3,9	10,86	2,8
hsa-miR-6083	< 1e-07	< 1e-07	17,27	47,37	2,8
hsa-miR-4715-5p	1,50E-06	2,91E-05	19,03	55,02	2,9
hsa-miR-2467-3p	4,00E-06	5,73E-05	13,16	37,49	2,9
hsa-miR-4539	5,40E-06	7,15E-05	23,49	67,09	2,9
hsa-miR-4322	6,60E-06	8,12E-05	53,3	151,38	2,9
hsa-miR-4486	8,00E-06	9,32E-05	44,88	129,82	2,9
hsa-miR-4513	1,27E-05	0,000123	13,31	38,44	2,9
hsa-miR-5196-5p	1,73E-05	0,000143	51,91	149,67	2,9
hsa-miR-4733-5p	6,75E-05	0,000421	33,04	93,49	2,9
hsa-miR-1471	0,0002693	0,0012	95,8	271,27	2,9
hsa-miR-1185-1-3p	0,0002802	0,00122	171,73	484,52	2,9
hsa-miR-3187-5p	0,0007552	0,00267	10,04	28,94	2,9
hsa-miR-6088	< 1e-07	< 1e-07	2017,01	5728,73	2,9
hsa-miR-4642	4,90E-06	6,69E-05	6,16	18,27	2,9
hsa-miR-6068	8,40E-06	9,41E-05	701,35	2047,43	2,9
hsa-miR-4497	3,63E-05	0,000264	1086,9	3211,87	2,9
hsa-miR-371b-5p	4,15E-05	0,000292	224,1	651,67	2,9
hsa-miR-1246	0,0002985	0,00129	418,19	1233,72	2,9
hsa-miR-378c	0,0006628	0,00237	8,01	23,26	2,9
hsa-miR-2861	4,00E-07	1,13E-05	646,27	1934,31	3,0
hsa-miR-1268b	7,00E-07	1,57E-05	881,61	2646	3,0
hsa-miR-4472	1,90E-06	3,46E-05	9,97	30,41	3,0
hsa-miR-572	5,20E-06	6,99E-05	465,29	1391,09	3,0
hsa-miR-762	0,0001689	0,000829	338,26	1025,99	3,0
hsa-miR-183-3p	0,0011999	0,00383	10,4	31,1	3,0
hsa-miR-5187-5p	0,0022936	0,0063	5,21	15,55	3,0
hsa-miR-3940-5p	< 1e-07	< 1e-07	291,63	895,66	3,0
hsa-miR-4640-5p	7,00E-07	1,57E-05	16,56	52,06	3,1
hsa-miR-638	7,00E-07	1,57E-05	2053,69	6374,07	3,1
hsa-miR-4433a-3p	8,00E-07	1,66E-05	125,71	391,59	3,1

Cont/ Apêndice 1

Unique ID	Valor de p	FDR	Expressão média em amostras Normais	Expressão média em Tumores de Ovário	Fold-change
hsa-miR-663a	1,30E-06	2,58E-05	68,88	217,97	3,1
hsa-miR-4463	2,00E-06	3,50E-05	265,76	819,61	3,1
hsa-miR-149-3p	2,90E-06	4,30E-05	13,7	43,28	3,1
hsa-miR-3934-3p	8,10E-06	9,32E-05	8,69	27,42	3,1
hsa-miR-4706	1,47E-05	0,000134	6,01	18,92	3,1
hsa-miR-4436b-3p	4,67E-05	0,000312	6,98	21,6	3,1
hsa-miR-4300	0,0004141	0,00166	3,08	9,63	3,1
hsa-miR-3656	< 1e-07	< 1e-07	815,76	2589,4	3,1
hsa-miR-1224-5p	3,00E-07	1,05E-05	365,57	1192,03	3,2
hsa-miR-4259	1,90E-06	3,46E-05	10,54	33,53	3,2
hsa-miR-371a-5p	2,60E-06	4,13E-05	58,49	187,09	3,2
hsa-miR-3663-5p	0,0004561	0,00178	13,55	44,31	3,2
hsa-miR-4707-5p	2,00E-07	7,95E-06	31,43	103,77	3,3
hsa-miR-6511b-5p	3,53E-05	0,000259	24,05	79,08	3,3
hsa-miR-1587	7,92E-05	0,000471	435,94	1437,35	3,3
hsa-miR-937-5p	2,00E-07	7,95E-06	178,03	611,92	3,4
hsa-miR-1227-5p	2,00E-06	3,50E-05	362,54	1265,95	3,4
hsa-miR-3185	0,0002797	0,00122	4,78	16,27	3,4
hsa-miR-431-5p	0,0010505	0,00352	67	229,38	3,4
hsa-miR-4750-5p	6,00E-07	1,50E-05	8,2	28,99	3,6
hsa-miR-6089	1,56E-05	0,000136	2259,83	8184,6	3,6
hsa-miR-365a-5p	2,00E-07	7,95E-06	10,91	41,45	3,8
hsa-miR-4526	0,0003402	0,0014	2,99	11,95	4,0
hsa-miR-1268a	< 1e-07	< 1e-07	450,69	1948,84	4,3
hsa-miR-6084	4,00E-07	1,13E-05	5,23	24,16	4,5
hsa-miR-4453	0,0001213	0,000658	8,51	43,74	5,3
hsa-miR-934	1,28E-05	0,000123	3,79	24,73	6,7
hsa-miR-639	1,67E-05	0,000141	2,34	15,55	6,7
hsa-miR-663b	< 1e-07	< 1e-07	8,73	63,65	7,1

Apêndice 2 - Tabela suplementar 2 – Expressão dos miRNAs hsa-miR-143-3p e hsa-miR-934 associada ao tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Variável	Cutoff	N	Recorrência	Log-Rank	HR	IC (95%)	p
hsa-miR-934 tumor	>250,00	40	33	0,257	1,314	0,8183-2,1088	0,258
	≤250	52	36				
hsa-miR-143 tumor	>20,0	80	62	0,45	1,119	0,5698-3,5335	0,4
	≤20,0	8	5				
hsa-miR-934 estroma	>150,00	45	36	0,304	1,312	0,7806-2,2060	0,36
	≤150,00	29	24				
hsa-miR-143 estroma	>100,00	32	24	0,192	6,97	0,4037-1,2023	0,19

Variável	Cutoff	N	Óbito	Log-Rank	HR	IC (95%)	p
hsa-miR-934 tumor	>150,00	79	41	0,022	4,532	1,0948-18,758	0,0371
	≤150,00	13	2				
hsa-miR-143 tumor	>100,00	85	40	0,288	2,8	0,3846-20,428	0,39
	≤100,00	4	1				
hsa-miR-934 estroma	> 0	71	36	0,262	2,927	0,4-21,381	0,29
	= 0	4	1				
hsa-miR-143 estroma	>100,00	33	16	0,374	0,7375	0,6967-2,639	0,37

Apêndice 3 - Tabela suplementar 3 – Expressão das proteínas FZD3 e Beta-catenina associada ao tempo de sobrevida livre de doença e a sobrevida global.

Variável	Cutoff	N	Recorrênci a	Log- Rank	HR	IC (95%)	p
FZD3 citoplasma	>100,0 0	7	7	0,085	1,996	0,8952- 4,4484	0,09
	≤100,0 0	70	51				
FZD3 nucleo	>1,0	8	4	0,06	3,866	0,386- 1,0717	0,06
	≤1,0	68	53				
Beta-Catenina	>20,0	63	48	0,358	7,565	0,4163- 1346	0,3
	≤20,0	16	14				
Variável	Cutoff	N	Óbito	Log- Rank	HR	IC (95%)	p
FZD3 citoplasma	>20,0	39	24	0,02	2,153	1,109- 4,177	0,023
	≤20,0	39	14				
FZD3 nucleo	> 0	22	13	0,124	1,699	0,8635- 3,3411	0,125
	= 0	55	24				
Beta-Catenina	>30,0	62	34	0,169	1,836	0,7674- 4.3917	0,172
	≤30,0	18	6				