

**O USO DA CITOLOGIA LIQUIDA
PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA
E PROTEICA DE MARCADORES DA VIA WNT
ASSOCIADOS A TUMORES DE OVÁRIO**

ERIKA REGINA MATHEUS MALENTACCHI

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Levon Badiglian Filho

**Co-Orientadores: Prof^a. Dra. Silvia Regina Rogatto e
Dra. Louise de Brot Andrade**

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Malentacchi, Erika Regina Matheus

O uso da citologia líquida para avaliação da expressão gênica e proteica de marcadores da via WNT associados a tumores de ovário /

Erika Regina Matheus Malentacchi – São Paulo, 2019.

100p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Levon Badiglian Filho

Descritores: 1. Neoplasias Ovarianas/Ovarian Neoplasms. 2. Via de Sinalização Wnt/Wnt Signaling Pathway. 3. Expressão Gênica/ Gene Expression. 4. Histoquímica / Histochemistry. 5. Biomarcadores/ Biomarkers

“O sucesso é a soma de pequenos esforços, repetidos dia sim e no outro também”.

Robert Collier

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vêm do pensamento que não há ciência sem colaboração. Em época de redução de recursos na pesquisa encontrei pessoas que me ajudaram a realizar uma pesquisa com todas limitações e dificuldades que possam ter aparecido no caminho. Não é possível que um aluno, mestrando ou doutorando desempenhe um trabalho e alcance um resultado sem que sejam dados recursos e condições adequadas para isso. E por ter recebido toda essa ajuda, pude me encontrar em um ambiente de ganho onde o objetivo de todos ao meu redor era fazer dar certo. A vocês, meus sinceros agradecimentos.

Ao A.C.Camargo Cancer Center pela estrutura para o estudo e pela oportunidade da interação com nossas pacientes.

À Dr^a. Claudia Malheiros e sua técnica Katia Klung, que me auxiliaram nas técnicas de biologia molecular, a receptividade e ensinamentos de vocês foram muito importantes e me fizeram sentir acolhida no Centro Internacional de Pesquisa - CIPE.

Ao Dr. Glauco Baiocchi, pelo enorme incentivo financeiro e por sempre me aconselhar durante as coletas. Obrigado pela generosidade.

Aos médicos titulares do departamento de Ginecologia que me receberam durante suas cirurgias e por terem tido paciência com o tempo da coleta; Dr. Ademir Narcizo, Dr. Carlos Faloppa, Dr. Glauco Baiocchi Neto, Dr. Henrique Mantovan, Dr^a Lillian Kumagai e Dr. Levon Badiglian Filho.

Ao centro cirúrgico do AC Camargo que disponibilizou estrutura adequada para coleta das amostras.

Aos técnicos dos laboratórios do CoreFacility e do Biobanco que me auxiliaram; Eloisa, Ana Paula, Louise, Marina, Laís, Rafaela, Rômulo e Severino, vocês todos tem grande contribuição nesta pesquisa.

Ao órgão de fomento Conselho Nacional de Pesquisa do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto e bolsa

Aos professores da pós-graduação, pela enorme contribuição na minha formação durante aulas e seminários.

À Suely Francisco e sua equipe da biblioteca, por toda ajuda nesses anos e pela colaboração final com a tese. Suely você é peça chave para que todo aluno se sinta amparado no final de uma tese.

À Pós-Graduação que disponibilizou de todo suporte e ao Dr. Rubens Chojniak, pelos esforços para que eu conseguisse a verba necessária para a experiência internacional na Dinamarca, tão importante para mim.

À Dr^a Luisa Matos do Canto, sempre tão querida que me recepcionou na Dinamarca e fez de tudo para que eu me sentisse bem e em casa. Lu, com certeza os dias frios e longe dos meus bebês teriam sido ruins se eu não tivesse você para me ajudar em tudo, os almoços, os desafios, os conselhos, e por ser minha professora nos dias de experimentos.

À Dr^a. Louise De Brot Andrade, co-orientadora e patologista, que me auxiliou no processamento histopatológico e seleção das amostras. Muito obrigado por ser sempre muito paciente e gentil para esclarecer todas as minhas dúvidas e em colaborar com seu conhecimento para solucionar as dificuldades.

À University of Southern Denmark, em Vejle na Dinamarca pelo aceite do estágio e pela completa estrutura para realização do experimento.

À Dr^a Silvia Regina Rogatto pela receptividade na Dinamarca, pela prestatividade e generosidade em contribuir para minha pesquisa, me fazendo acreditar que não estamos sozinhos como alunos. Seu apoio foi fundamental e são professores como você que são lembrados por nós. Você não é apenas uma grande pesquisadora, mas uma grande pessoa.

Ao Dr. Levon Badiglian Filho, meu orientador, pelo acolhimento no projeto, pela compreensão da minha ausência quando engravidei dos gêmeos, por ser sempre tão paciente e gentil e por confiar sempre na minha capacidade e nas minhas opiniões, mesmo ainda tendo muito o que

aprender. Que o mundo dos orientadores conte com mais orientadores como você, sempre com uma palavra de incentivo e apoio.

A todos os meus amigos que por anos da vida torceram por mim, principalmente à minha irmã, Nathalia Souza (*in memoriam*), que nos deixou há poucos meses formando um buraco em meu coração. Preenchia minha vida com o exemplo de garra e superação e se alegrava com todas as minhas conquistas, e por este exemplo continuarei tendo garra para crescer e superar etapas. Obrigada, eternamente.

Aos membros da banca da defesa Dra. Celina Tizuko Fujiyama Oshima, Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório, Dr. Jesus de Paula Carvalho e Dr. Tiago Goss dos Santos por todas as críticas e sugestões pertinentes e extremamente valiosas para minha tese e por tantos elogios carinhosos.

À toda minha família por me apoiarem nesses últimos anos, principalmente minha mãe, meu marido, e minha sogra Beatriz, que sempre foram o meu backup para cuidar dos gêmeos tão bebês enquanto eu precisava finalizar uma pesquisa. Sem o apoio de vocês certamente eu não teria conseguido.

Aos meus pais, Iara e Mario, por sempre se orgulharem de mim e terem me direcionado no caminho do bem.

Ao meu marido Rafael, por ser um pai tão presente quando eu precisei de apoio para ficar até tarde escrevendo e por cuidar de nós sempre.

Aos meus bebês, Enrico e Lorenzo, que mesmo ainda sem falarem já conseguem me ensinar tanto e me darem motivos diários a evoluir como profissional e como pessoa. Qualquer passo que eu dê na vida será para ser capaz de guiá-los no caminho do bem e do amor.

E mais importante, às pacientes, que em meio à momentos de dor, e doaram não só um tempo, mas uma parte de si para que possamos buscar sempre o melhor para todos.

À Deus, por ser meu maior porto seguro.

Muito obrigado!

RESUMO

Malentacchi ERM. **O uso da citologia líquida para avaliação da expressão gênica e proteica de marcadores da via WNT associados a tumores de ovário.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Pouco frequente, o câncer de ovário é hoje responsável por 4% dos tumores ginecológicos, já em avanço quando diagnosticado devido ausência de métodos de rastreamento e diagnóstico efetivos. A via de sinalização WNT, que se encontra alterada em cânceres, possui papel importante no câncer de ovário podendo causar graves efeitos como disfunções e doenças quando desregulada. O objetivo foi avaliar a correlação entre expressão gênica e proteica dos marcadores WNT5a e WNT7a e o papel da coleta de citologia líquida e da imuno-citoquímica como possível auxílio diagnóstico. Foram coletadas no A.C.Camargo Cancer Center entre 2016 e 2017 amostras citológicas para expressão gênica por qRT-PCR e proteica por imuno-citoquímica e amostras de tecidos parafinizados para expressão global de transcritos e imuno-histoquímica. Os genes WNT5a e WNT7a não apresentaram concordância entre si, porém a expressão aumentada do gene WNT5a foi significativa com o aumento do número de filhos, com o uso de anticoncepcional e a idade avançada. A proteína WNT5a foi associada ao aumento do número de filhos. As proteínas por imuno-citoquímica se correlacionaram de forma significativa entre si, mostrando um possível crosstalk à nível proteico, e não houve diferença significativa entre as técnicas de imuno-citoquímica e imuno-histoquímica. A expressão gênica foi inversa à expressão das proteínas, uma possível evidência de que outros mecanismos estão relacionados às proteínas envolvidas no ciclo celular independente da integridade da via WNT. A expressão de transcritos mostrou outros genes da via WNT associados ao diagnóstico, significativos quando correlacionados entre si, sendo possíveis alvos de estudos futuros

para auxílio diagnósticos ou prognósticos de câncer de ovário. Os resultados da imuno-citoquímica se mostraram pertinentes com os dados da literatura, porém ainda sem uma conclusão definitiva sobre o papel da citologia líquida e imuno-citoquímica no diagnóstico. Novos estudos devem ser realizados abordando um maior número amostral além de outras técnicas de quantificação proteica a fim de validar a imuno-citoquímica, o que beneficiará não somente pacientes no que diz respeito a invasividade, mas também um efetivo método de diagnóstico.

Descritores: Neoplasias Ovarianas. Via de Sinalização Wnt. Expressão Gênica. Histocitoquímica. Biomarcadores

SUMMARY

Malentacchi ERM. [The use of liquid citology for the gene and protein expression of WNT markers associated with ovarian tumors]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Less common, ovarian cancer is responsible for 4% of gynecological tumors, usually in advanced stage when diagnosed due to the absence of effective screening and diagnostic methods. The WNT5a and WNT7a genes were not concordant, but the increased expression of the WNT5a gene was significant with increased numbers of children, oral contraceptive use and advanced age. The WNT5a protein was associated with increased numbers of children. Proteins expression by immuno-cytochemistry correlated significantly with each other, showing a possible crosstalk at the protein level, and there was no significant difference between the immuno-cytochemistry and immunohistochemistry techniques. Gene expression was inverse to protein expression, a possible evidence that other mechanisms are related to the proteins involved in the cell cycle independent of the integrity of the WNT pathway. Transcripts expression showed other genes of the WNT pathway associated with diagnosis and significant when correlated with each other, being possible targets of future studies for prognostic help of ovarian cancer. Immuno-cytochemistry results were pertinent with the literature but there was no definitive conclusion about the role of liquid and immuno-cytochemical cytology in prognosis. New studies could be carried out with a larger number of samples and other quantification proteins techniques to validate immuno-cytochemistry, which will help not only patients about invasiveness but also an effective method of prognosis.

Key-words: Ovarian Neoplasms. Wnt Signaling Pathway. Gene Expression. Histocytochemistry. Biomarkers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do funcionamento da via Wnt/ β -catenina.	13
Figura 2	Ilustração dos diferentes tipos de marcações celulares utilizados nas análises de Imucitoquímica, a depender do tipo de antígeno e da marcação alvo do anticorpo.....	36
Figura 3	Marcações proteicas de WNT5a em diferentes casos clínicos	39
Figura 4	Marcações proteicas de WNT7a em diferentes casos clínicos	42
Figura 5	Marcações proteicas de WNT5a em diferentes casos clínicos de histopatologia FPPE	44
Figura 6	Marcações proteicas de WNT7a em diferentes casos clínicos de histopatologia FPPE	45
Figura 7	Descrição da distribuição dos transcritos diferencialmente expressos entre os grupos comparativos e a predominância dos genes aumentados e diminuídos nas 17 amostras analisadas.....	54
Figura 8	Diagrama de Venn representativo da comparação e distribuição do número de transcritos diferencialmente expressos em comum nos diferentes grupos.....	55

Figura 9	<i>Heatmaps</i> demonstrativos das sondas cujos valores correspondem a expressão dos transcritos, em log ₂ , e são variados dependendo da sua matriz de expressão.....	56
Figura 10	Genes encontrados diferencialmente expressos nas três vias possíveis de ativação da via WNT.....	58
Figura 11	Grau de associação entre os genes <i>WNT5a</i> e <i>WNT7a</i> com os genes transcritos encontrados como diferencialmente expressos e dos outros genes entre si.....	60
Figura 12	Box splot representativo da comparação visual entre dois grupos; a distribuição dos genes nas diferentes amostras clínicas normais/benignas e malignas.....	63
Figura 13	Representação do nível proteico e transcricional de <i>WNT5a</i> e <i>WNT7a</i> no cromossomo 3 e diversos tecidos do trato reprodutor feminino.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descritiva dos dados epidemiológicos segundo variáveis sociais como número de filhos e variáveis que expressam estilo de vida como tabagismo, etilismo, uso de anticoncepcional oral, bem como diagnóstico de tumores não ginecológicos anteriores ao estudo, dados coletados no A.C.Camargo Cancer Center, 2018	30
Tabela 2	Número total de casos de câncer de ovário e outros tipos tumorais, nos últimos 10 anos no A.C.Camargo Cancer Center	31
Tabela 3	Distribuição dos níveis de expressão gênica de <i>WNT5a</i> nos distintos grupos.....	32
Tabela 4	Distribuição dos níveis de expressão gênica de <i>WNT5a</i> nos distintos grupos.....	33
Tabela 5	Associação do risco de neoplasia com os níveis de expressão gênica de <i>WNT5a</i> e <i>WNT7a</i>	34
Tabela 6	Tabela cruzada de distribuição entre os genes <i>WNT5a</i> e <i>WNT7a</i> e o nível de concordância entre a expressão gênica.	35
Tabela 7	Distribuição dos níveis de expressão proteica de <i>WNT5a</i> nos distintos grupos.....	37

Tabela 8	Associação do risco de neoplasia com os níveis de expressão proteica de WNT5a	38
Tabela 9	Distribuição dos níveis de expressão proteica de WNT7a nos distintos grupos.....	40
Tabela 10	Associação do risco de neoplasia com os níveis de expressão proteica de WNT7a	41
Tabela 11	Tabela cruzada de distribuição entre as marcações das proteínas WNT5a e WNT7a e o nível de concordância entre a expressão proteica	43
Tabela 12	Tabela cruzada entre as marcações das proteínas WNT5a e WNT7a e o nível de concordância entre as técnicas de imuno-citoquímica e imuno-histoquímica	46
Tabela 13	Representação estatística da associação dos dados clínicos e sociológico com o diagnóstico	48
Tabela 14	Associação entre as variáveis qualitativas e as expressões dos genes e das proteínas mostrando valor de p (significância $p < 0,05$).....	49
Tabela 15	Associação entre expressão gênica e expressão proteica	51

Tabela 16	Associação entre expressão gênica e expressão proteica por imuno-citoquímica.....	52
Tabela 17	Significância da associação entre os genes <i>WNT5a</i> e <i>WNT7a</i> com os genes da via WNT encontrados diferencialmente expressos no transcriptoma	59
Tabela 18	Significância dos genes em relação a sua distribuição nos grupos normais, benignos e malignos. Valores apresentando n, valor mínimo e máximo, média, mediana, desvio padrão e valor de p	62

LISTA DE SIGLAS

ACO	Anticoncepcional oral
ACTB	Gene endógeno <i>β-actina</i>
AGCC*	<i>Affymetrix GeneChip Command Console Software</i>
ANOVA*	<i>Analysis of Variance</i>
Alu	<i>Arthrobacter luteus</i>
anti-WNT5A	Anticorpo contra WNT5a
APC*	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BRCA*	<i>Breast Cancer gene</i>
CA 125*	<i>Cancer antigen 125</i>
cDNA*	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase e Datp</i>
DAB*	Diaminobenzidina tetrahidrocloroeto
ΔCT	Número do ciclo em que a transcrição do gene é detectável
DEG*	<i>Differentially expressed genes</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DNA*	Deoxyribonucleic acid.
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
Dsh	Dishevelled
Dkk-1	Dickkopf-1
FC*	<i>Fold-change</i>
FDR*	<i>False Discovery Rate</i> - método utilizado no teste de hipóteses múltiplas
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FFPE*	<i>Formalin-fixed, Paraffin-embedded</i>
FZD	Frizzled
GEO*	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GO*	<i>Genic ontology</i>
GSK-3	Glicogênio sintase cinase
GTPases	Guanosina trifosfatases
HPV*	<i>Human Papilloma Viruses</i>

IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IVT*	<i>In vitro transcription</i>
JNK	Proteína quinase ativada por estresse
KEGG*	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LRP*	<i>Lipoprotein receptor-related protein</i>
MMP	Metaloproteinase de matriz
miR-1207	MicroRNA 1207
N	Casos efetivamente analisados em cada plataforma
OR*	<i>Odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBECs	Células epiteliais brônquicas primárias derivadas de controle
PCR*	<i>Polymerase chain reaction</i>
POP	Protocolo operacional padrão
PKC	Proteína quinase C
QR	Quantificação relativa
qRT-PCR*	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> <i>quantitative real time</i>
ROR	Receptor tirosina-quinase
TCGA*	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
RNA*	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAm	RNA mensageiro
SKOV3	Linhagem celular de câncer de ovário
TAC*	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TCF*	<i>T Cell factor</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF*	<i>Tumor grow factor</i>
TIMP*	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMA*	<i>Tissue microarray</i>
WNT*	<i>Wingless + Integration</i>

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Ovário	1
1.2	Coleta Cérvico-Vaginal	6
1.3	Marcadores moleculares da via WNT	8
1.4	Justificativa	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	CASUÍSTICA.....	16
3.1	Pacientes e espécimes.....	16
3.2	Crterios de incluso e exclusão	17
4	METODOLOGIA	18
4.1	Coleta das amostras.....	18
4.2	Preparação de lâminas.....	19
4.3	Imuno-citoquímica imuno-histoquímica	20
4.4	Extração de RNA – citologia líquida	22
4.5	Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real - qRT-PCR.....	23
4.6	Ensaio de expressão global de transcritos	24
4.7	Análise Estatística	27
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Epidemiologia descritiva	29
5.2	Ensaio de expressão gênica - qRT-PCR.....	31
5.3	Análise dos dados de imuno-citoquímica e imuno-histoquímica	35
5.4	Epidemiologia associada ao diagnóstico	47

5.5	Expressão gênica e proteica associadas aos fatores epidemiológicos	48
5.6	Expressão gênica associada à expressão proteica	50
5.7	Análise da expressão global de transcritos	52
6	DISCUSSÃO	65
6.1	Epidemiologia associada ao diagnóstico e às alterações gênicas e proteicas	65
6.2	Associação do risco de câncer com expressão gênica e proteica.....	73
6.3	Análise da expressão global de transcritos e sua associação com a via WNT	84
7	CONCLUSÕES	90
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ANEXOS

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

Anexo 2 Carta de colaboração da University of Southern Denmark

Anexo 3 Carta de estágio realizado no Departamento de Genética Clínica da University of Southern Denmark

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Apêndice 2 Formulários de alteração de título

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE OVÁRIO

Embora os cânceres do aparelho reprodutor feminino estejam cada vez menos incidentes em número de casos e mortalidade, o câncer de ovário ainda é caracterizado por alta taxa de letalidade nas pacientes, apresenta devido ao diagnóstico tardio. Entre os cânceres que afetam especificamente mulheres, a maior incidência mundial, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA, é o câncer de mama. Os carcinomas do trato ano-genital, particularmente o câncer do colo do útero, são responsáveis por quase 12% de todos os carcinomas na mulher, e por isso representam a terceira maior causa de neoplasia ginecológica no Brasil, sendo evitável e curável se detectado precocemente por se desenvolver de maneira lenta e previsível (Ministério da Saúde 2018a e b).

Segundo o INCA, são estimados cerca de 6.150 novos casos de câncer do ovário no Brasil para cada ano do biênio de 2018-2019 com aproximadamente 3.536 mortes, mostrando que mais de 50% das pacientes vão a óbito (Ministério da Saúde 2018a e b). A taxa padronizada pela idade estima um risco 6,6 casos a cada 100 mil mulheres no mundo, segundo a GLOBOCAN (International Agency for Research on Cancer-IARC 2019).

No entanto nem todos os cânceres ginecológicos se manifestam de maneira lenta com diagnóstico precoce, como é o caso do câncer de ovário

onde cerca de 3/4 das pacientes se encontram em estágio avançado da doença (III-IV) no momento da descoberta. O difícil diagnóstico precoce diminui a chance de cura com uma taxa baixa de sobrevida em 5 anos (12-30%) (CHU e FISHMAN 2014; Ministério da Saúde 2018a e b). NAGARAI et al. (2015), relataram que esta sobrevida global pobre é principalmente devido ao diagnóstico em estágio avançado, a recorrência da doença e resistência à quimioterapia baseada em platina.

A suspeita do câncer de ovário é realizada por histórico da paciente e dados clínicos, onde realiza-se exames de imagem para identificação de possível presença de massa anexial, além de exame físico e laboratorial. Caso haja suspeita fundamentada de malignidade é realizado procedimento cirúrgico. Em pacientes com suspeita de disseminação intra-abdominal é possível realizar exames abdominais e pélvicos para verificação de ascite e extensão da doença. Os casos de metástase pulmonar, linfadenomegalia mediastinal e derrame pleural podem ser diagnosticados por Raio-X ou Tomografia computadorizada. No entanto, a análise histopatológica é considerada padrão-ouro na confirmação tumoral coletada após laparotomia exploratória (Ministério da Saúde 2018b).

Segundo o INCA, os cânceres de ovário se classificam em três tipos, sendo a maioria tumores epiteliais (95%) que se iniciam nas células da superfície. Dentre os tumores epiteliais, há alguns subtipos tumorais como os serosos, mucinosos, endometrióides, tumores de células transicionais, tumores de células claras, carcinoma escamoso, misto e indiferenciados (Ministério da Saúde 2018b).

Os cânceres epiteliais representam 95% dos cânceres de ovário, os outros 5% são tumores de células germinativas ou tumores de células estromais e cordões sexuais. Dentre os cânceres epiteliais de ovário há subtipos que diferem entre si pela morfologia e alterações moleculares sendo o mais comum o seroso de alto grau (70%), seguido pelo endometrióide (10%), células claras (10%), mucinosos (2-4%), serosos de baixo grau (<5%) e outros mais raros como carcinoma de células transicionais, carcinosarcoma e carcinoma de pequenas células (CHEN et al. 2003; ACS 2015; TÉTRARRE et al. 2015).

Um estudo realizado com pacientes muito jovens (<30 anos), jovens (30-60 anos) e mais velhas (>60 anos), mostrou que as mulheres muito jovens nos grupos de jovens e mais velhas tiveram estimativa de sobrevivência específica da doença em 5 anos em 78,8%, 58,8 e 35,3%, respectivamente. Os dados mostraram que mulheres mais jovens com câncer epitelial de ovário sobrevivem mais em comparação com pacientes mais velhos (CHAN et al. 2006).

Os fatores de risco associados ao câncer de ovário incluem: as ovulações contínuas que tem potencial para estimular a carcinogênese das células do epitélio do ovário; as gonadotrofinas circulantes que podem estimular as células epiteliais ovarianas induzindo alterações neoplásicas; um estímulo direto dos hormônios sexuais, no qual os hormônios estrogênicos e androgênicos induziriam e os progestágenos inibiriam a carcinogênese; estímulos inflamatórios relacionados a própria ovulação ou doenças ginecológicas como a endometriose e a doença inflamatória

pélvica. A história familiar de câncer de mama ou ovário é um dos principais fatores de risco descritos para o câncer de ovário (HUNN e RODRIGUEZ 2012). Alguns fatores de risco adicionais incluem a presença de endometriose, nuliparidade e infertilidade refratária. Entre os fatores que diminuem o risco de câncer de ovário estão a multiparidade, amamentação, uso de contraceptivos orais, cirurgia de ligadura tubária e histerectomia mesmo sem ooforectomia ou salpingectomia (HUNN e RODRIGUEZ 2012). Com cinco anos de uso de contraceptivos orais, as mulheres podem reduzir o risco de câncer de ovário em aproximadamente 50% (HOLSCHNEIDER e BEREK 2000; FABER et al. 2013; KIM et al. 2014).

Embora alguns fatores prognósticos estejam descritos como importantes para o câncer de ovário epitelial como a citorredução ótima na cirurgia, tipo histológico, hormônios esteróides, idade, estágio tumoral e grau histológico do tumor, DITTO et al. (2019) relatou em uma análise multivariada que a idade ao diagnóstico (HR 1,68, 95% CI 1,14-2,47) e o estágio tumoral (HR 2,29, IC 95% 1,01-6,39) foram fatores preditivos independentes para pior sobrevida global sendo a classificação de estágio FIGO o fator prognóstico mais importante para recorrência e sobrevida em pacientes com tumores epiteliais.

SHOCK et al. (2014) realizaram um estudo caso controle com mulheres grávidas que posteriormente foram diagnosticadas com câncer de ovário epitelial para investigar a associação entre as concentrações circulantes de esteróides sexuais ao pré-diagnóstico. Embora não tenha sido observada uma associação entre as concentrações de esteróides sexuais a

tumores invasivos serosos, os autores detectaram um aumento da concentração de testosterona e 17-hidroxiprogesterona. Estes achados estavam associados com aproximadamente 40% de aumento do risco de tumores serosos. Além disso, as concentrações de andrógenos foram associadas com um risco aumentado em 50% de desenvolver tumores mucinosos e o risco de tumores endometrióides aumentou com concentrações mais elevadas de estradiol. Os autores concluíram que hormônios esteróides sexuais possuem um papel importante na etiologia do câncer de ovário epitelial.

Outros estudos de CASAGRANDE et al. (1979) e HOLSCHNEIDER e BEREK (2000) também mostraram que o excesso de gonadotrofina e andrógenos são fatores de risco, assim como a teoria da ovulação incessante, exposição dos ovários às contaminantes pélvicos e substâncias cancerígenas podem desempenhar um papel na patogênese do câncer de ovário.

Para o câncer de ovário não são conhecidas medidas preventivas eficazes ou uma ferramenta de rastreio eficaz. Há evidências que sugerem que a maioria das pacientes apresenta alguns sintomas não-específicos no ano anterior ao diagnóstico, porém a doença geralmente não é encontrada até que esteja em um estágio avançado, como citado anteriormente (ROOTH 2013; GRAYSON et al. 2019).

O tratamento padrão é a cirurgia de citorredução para os tumores malignos e cirurgia de salpingooforectomia e histerectomia para os casos benignos, em conjunto com quimioterapia com carboplatina e paclitaxel.

Atualmente, a pontuação de risco de malignidade é calculada pelos níveis do antígeno CA125 detectado no soro, escore ultrassonográfico e status menopausal (MARTH et al. 2017). Os aspectos ainda incertos do câncer de ovário e da ausência de mais testes efetivos no rastreamento e detecção precoce, leva a um aumento da mortalidade e morbidade. Isso destaca a necessidade de novos métodos de auxílio prognóstico e diagnóstico, como os marcadores bioquímicos e moleculares que se tornam variáveis cada vez mais importantes.

1.2 COLETA CÉRVICO-VAGINAL

O método de rastreio citológico é capaz de prevenir e detectar precocemente lesões uterinas e tumores. O teste tradicional, conhecido como método de Papanicolaou, comprometido ao longo do tempo por apresentar altos índices de resultados falso-negativos, foi substituído por pelo método de citologia em meio líquido, o qual permite a avaliação citológica com maior sensibilidade e especificidade além da coleta de DNA, que pode ser útil para estudos moleculares diversos ou para a detecção do HPV (*Human Papilloma Virus*) conhecido por ser o agente etiológico bem estabelecido do do câncer uterino (KINDE et al. 2013).

Recentes estudos buscam estratégias mais eficazes para o diagnóstico de tumores de ovário. ABASSI (2018) relatou um novo teste de esfregaço de colo uterino colhido rotineiramente, o PapSEEK, tipo de biópsia líquida que identifica alterações no DNA e que permite a análise de

mutações em 18 genes associadas a cânceres de ovário e útero. Os autores relataram a presença de mutações no colo uterino em 33% das 245 pacientes com câncer de ovário previamente diagnosticadas, e em 81% das 382 pacientes com câncer uterino sendo algumas em estágio inicial.

WANG et al. (2018) relataram que a sensibilidade do método com escova de Papanicolaou foi de 33% entre as 245 pacientes com câncer ovariano e apenas 1,4% das 714 mulheres sem câncer apresentaram amostras positivas para este ensaio. A coleta intrauterina permitiu o aumento da detecção da malignidade na amostragem endocervical com teste positivo em 45% das 51 pacientes com câncer de ovário, enquanto nenhuma das amostras de 125 mulheres sem câncer foi positiva, revelando uma especificidade de 100%. Dentre as pacientes que também possuíam DNA circulante no plasma (43%), a sensibilidade para câncer de ovário aumentou 63%.

Utilizando coleta por citologia em meio líquido, LEE et al. (2016), objetivaram desenvolver um método para testes de rotina de baixo custo baseado em seqüenciamento de DNA. Para isso investigaram as mutações *BRCA1* c.68_69del, *BRCA1*c.5266dup e *BRCA2* c.5946del por seqüenciamento de Sanger utilizando três conjuntos de iniciadores. As células cervicovaginais coletadas com ThinPrep® estavam preservadas e fixadas sendo então tratadas com proteinase K previamente extração do DNA. Os autores realizaram com sucesso os ensaios em citologia oncológica e testes de HPV a um baixo custo, acessível para inclusão em rotina hospitalar. Estes ensaios são úteis para avaliar os riscos de

desenvolver câncer do colo do útero, câncer de ovário e câncer de mama, entretanto, restrito a apenas três variantes dos genes, citadas acima.

É importante ressaltar a viabilidade da coleta citológica em meio líquido como uma ferramenta de grande valor na detecção precoce ou auxílio prognóstico dos tumores uterinos, mas também como possível auxílio na detecção precoce de tipos tumorais como de mama e ovário.

1.3 MARCADORES MOLECULARES DA VIA WNT

No estudo prévio de BADIGLIAN FILHO et al. (2009), responsável pela forma e idéia para esta pesquisa, onde encontraram resultados promissores em relação à via WNT e câncer de ovário, foram comparados três grupos; casos normais, casos benignos e casos malignos com a expressão proteica em amostras histológicas com cinco componente da via WNT, sendo eles; WNT5a, WNTt1, β -catenina, Frizzled-1 (FZD1) e Frizzled-5 (FZD5). Os autores concluíram que a expressão de WNT5a mostrou uma diferença significativa ($p=0,050$) entre marcação negativa e positiva sendo esta última de pior resultado para as pacientes, sugerindo o importante papel de WNT5a nas neoplasias malignas como preditor de mau prognóstico.

A via de sinalização WNT deriva do gene *Wingless* de *Drosophila* resultante no fenótipo sem asa quando mutado, e no nome do ortólogo de vertebrado, integrada ou INT-1.1. A família de genes *WNT* é responsável pela regulação de interação intercelular durante o desenvolvimento embrionário (KOMIYA e HABAS 2008). Foi descrita pela primeira vez no

desenvolvimento de tumores há mais de trinta anos por inserção pró-viral, pela indução da expressão do gene *INT-1*, até então desconhecido, promovendo em ratas, uma indução espontânea de hiperplasias e tumores de mama (NUSSE e VARMUS 1982).

A ativação da via WNT ocorre geralmente por eventos na própria via, como mutações gênicas, pela ligação de proteínas WNT aos seus receptores de superfície celular que interagem com o complexo de sinalização da axina ou combinação de eventos que influenciam as ações da β -catenina. Esses eventos intracelulares levam ao aumento da transcrição de genes importantes que atuam na proliferação, crescimento, diferenciação, apoptose, migração e angiogênese (YANG et al. 2014; NAGARAI et al. 2015).

WNTs são moléculas sinalizadoras altamente conservadas que podem agir por duas vias distintas, a via canônica, ativada pelas proteínas da classe I agindo por meio da β -catenina, responsável pela regulação e proliferação celular, e a via não canônica, ativada pelas proteínas da classe II e independente de β -catenina, cuja transdução de sinal ocorre via fosfoinosítídeos, responsável pela movimentação celular e tecidual (TOPOL et al. 2003; HERNANDEZ GIFFORD 2015). Sabe-se que a β -catenina é uma proteína chave na via de sinalização WNT e que sua expressão anormal, assim como de E-caderina e WNT1, são observadas. A sinalização de WNT, pelo complexo *β -catenina-TCF*, também reprime a transcrição. Um dos mecanismos é a repressão competitiva, pela qual o complexo *β -catenina-TCF* desloca ou inibe outros ativadores de transcrição de ligação do DNA

(MACDONALD et al. 2009). Porém, seu papel prognóstico e de valor preditivo ainda não é bem elucidado. Diversas *WNTs* foram descritas em humanos como: *Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt2b*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt6*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt8a*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b*, *Wnt10a*, *Wnt10b*, *Wnt11*, *Wnt16* (STANFORD 2019).

A via de sinalização WNT/ β -catenina está envolvida em diversas funções celulares em células de carcinoma de ovário, como por exemplo as proteínas associadas à membrana RING-CH (MARCH) pertencentes à família E3 Ubiquitina ligases, incluindo a proteína MARCH 7. Esta proteína possui papel na proliferação de células T estando expressa em diversos tipos celulares e tecidos, entretanto, seu papel no câncer de ovário não foi totalmente esclarecido. HU et al. (2015) relataram expressão aumentada de MARCH7 em carcinoma de ovário quando comparado às amostras de ovário normal. As células tumorais A2780 com expressão ectópica de MARCH-7 apresentaram aumento da expressão de β -catenina no citoplasma promovendo sua translocação para o núcleo, a qual levou a redução de E-caderina. Em adição, a linhagem SKOV3 que apresentava expressão diminuída de MARCH-7 levou a diminuição da expressão de β -catenina no citoplasma. A super-expressão de MARCH-7 foi associada à promoção tumoral (HU et al. 2015).

No trato reprodutor feminino, a WNT7a é exclusivamente expressa em células epiteliais atuando por meio de FZD no mesênquima e epitélio. Em carcinomas de endométrio, por exemplo, a WNT7a atua pela da via β -catenina, induzindo proliferação celular (YOSHIOKA et al. 2012).

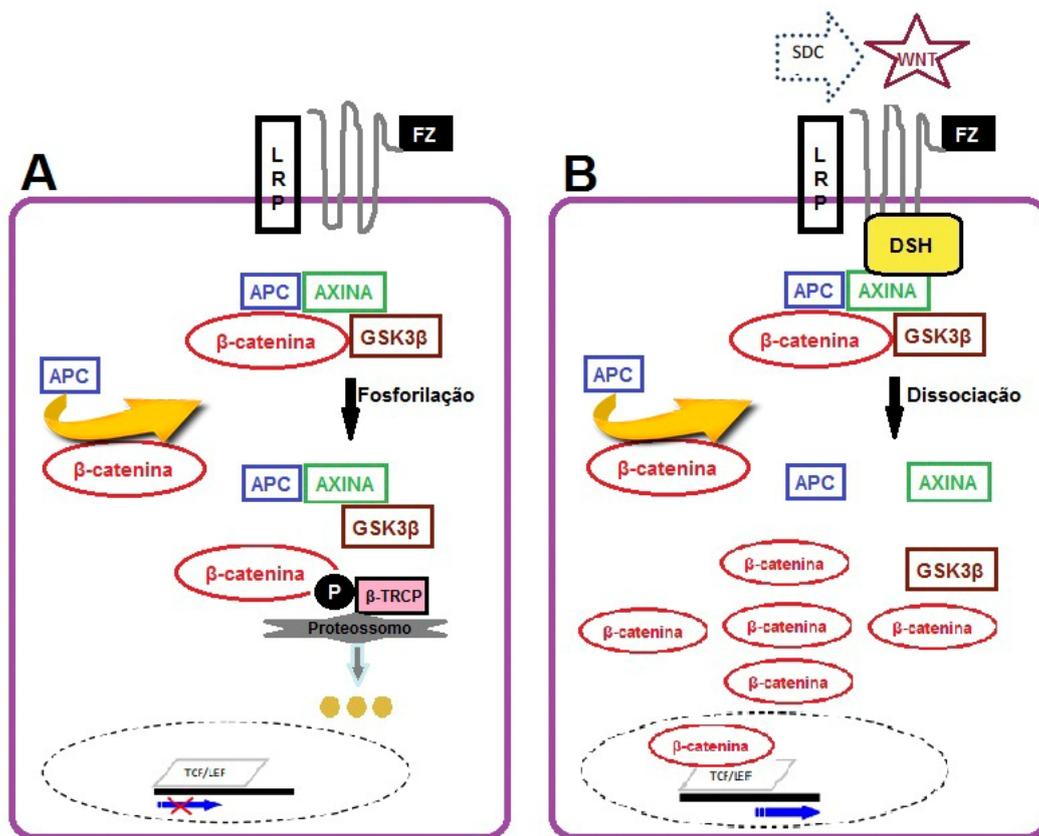
O receptor tirosina-quinase ROR2, membro da família Ror de tirosina-quinases receptoras, também conhecido como RORA, possui domínios estruturais característicos, desempenha um papel importante na morfogênese de desenvolvimento. NISHITA et al. (2006) demonstraram que ROR2 medeia WNT5a não-canônica por ativação da via WNT-JNK e inibe a via β -catenina-TCF. Segundo os autores, ROR2 pode mediar a formação de filopódios atuando na reorganização de actina, formação esta que requer a ligação da filamina à actina. Os autores observaram que a interrupção da formação de filopódios pela supressão da expressão de ROR2 ou filamina A, inibia a migração celular induzida por WNT5a, indicando que a formação de filopódios por meio de ROR2 é essencial para a migração celular induzida por WNT5a (NISHITA et al. 2006).

Em um estudo para caracterizar o papel da WNT7a no crescimento e progressão do tumor de ovário, camundongos *nude* foram inoculados por via intraperitoneal ou subcutânea com WNT7a de linhagem celular SKOV3.ip1. Os camundongos que receberam células SKOV3.ip1 com baixa expressão de WNT7a desenvolveram lesões tumorais significativamente menores, sugerindo o papel fundamental de Wnt7a durante a transformação maligna de células epiteliais do ovário, mediada por WNT/ β -catenina (YOSHIOKA et al. 2012).

BODNAR et al. (2014) utilizaram amostras de câncer de ovário de 46 pacientes submetidas a quimioterapia para avaliar a expressão proteica por imunohistoquímica de moléculas da via WNT/ β -catenina e E-caderina onde encontraram intensa expressão de E-caderina, β -catenina e WNT-1. A

expressão aumentada de β -catenina se mostrou um preditor desfavorável para sobrevida livre de progressão na análise multivariada (HR 2,19, IC 95% 1,09-4,39; $p = 0,028$) enquanto a expressão de β -catenina diminuída se mostrou um fator prognóstico para sobrevida global em pacientes com câncer de ovário em estágio avançado ($p = 0,039$). A marcação forte da expressão de β -catenina também foi associada significativamente à resistência à quimioterapia à base de platina ($p = 0,027$).

Embora a via WNT/ β -catenina seja controlada por reguladores negativos como proteína secretada Frizzled 1 (SFRP1), AXIN2 e inibidor de β -catenina e TCF-4, como relata WU G et al. (2015), não se sabe ao certo como as células tumorais compensam esses efeitos regulatórios e desencadeiam a ativação e inativação desta via. Os autores mostraram que via pode ser diretamente influenciada por microRNAs, que podem agir em diferentes alvos em nível pós-transcricional. Relataram expressão aumentada do *miR-1207*, o qual atua ativa a via WNT/ β -catenina, resultando em aumento nos níveis de células estaminais em câncer de ovário, e quando o *miR-1207* estava silenciado ocorria a diminuição dessas mesmas células.



Fonte: Adaptado de LOGAN e NUSSE (2004).

Figura 1 - Representação esquemática do funcionamento da via Wnt/β-catenina. **(A)**: Na ausência do sinal de Wnt a via permanece desativada pois por meio de interações com as quinases ativadas APC (polipose adenomatosa coli), GSK-3 (glicogênio sintase cinase 3) e Axina, ocorre a degradação da β-catenina por fosforilação (P). **(B)**: Quando ocorre exposição ao sinal de WNT a via é ativada ligando as proteínas WNT aos receptores Frizzled/LRP na superfície celular que sinalizam Dishevelled (Dsh) e Axina e levam à inibição da degradação de β-catenina. A β-catenina então acumula-se no citoplasma, podendo migrar para o núcleo onde se ligará com fatores de transcrição TCF/LEF (fator de célula T/Fator estimulador de linfócito) para controlar a transcrição das proteínas relacionadas à proliferação celular. Há ainda a via de polaridade da célula planar, que pode modificar o citoesqueleto.

Segundo MOON et al. (2004) as WNTs possuem funções importantes não apenas em células embrionárias, mas também em organismos adultos, e sua sinalização está ligada a uma variedade de doenças, especialmente o câncer. O autor questionava se a inibição da via de sinalização WNT poderia

formar a base de uma terapia eficaz para alguns tipos de câncer ou se mesmo sua ativação poderia fornecer novas terapias para outras condições clínicas. Muitos processos fisiológicos são regulados pela via de sinalização da WNT podendo levar a progressão tumoral se desregulados. Dentro destes processos estão angiogênese, metástase, proliferação celular, senescência e morte celular (YE et al. 2007; RAMACHANDRAN et al. 2011).

Segundo ANASTAS e MOON (2013) a alta frequência de mutações em genes dessa via e em diferentes neoplasias enfatiza a importância da via WNT durante a carcinogênese. Como os estudos mostram, a ativação da via WNT/ β -catenina está associada a resultados desfavoráveis em pacientes com câncer de ovário em diferentes estágios e subtipos tumorais. Por conta destes dados e pela ausência de métodos eficazes de rastreio e de auxílio prognóstico, questionamos se a via WNT/ β -catenina associada à coleta simples citológica e imuno-citoquímica não poderia ser uma ferramenta valiosa para detecção da diferenciação de massa anexial ovariana.

1.4 JUSTIFICATIVA

Encontrar uma resposta sobre a capacidade diagnóstica desses alvos em prever se uma massa anexial seria benigna ou maligna a partir da avaliação desses marcadores. Até o momento, não há nenhum biomarcador clinicamente validado que possa ser detectado de forma não invasiva.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imuno-citoquímica e gênica de WNT5a e WNT7a em células citológicas de pacientes portadoras de massa anexial ovariana, benignas e malignas, para investigar seu papel como biomarcadores de diagnóstico. Também avaliar a capacidade do ensaio de imuno-citoquímica por meio de coleta de citologia líquida como um método de auxílio diagnóstico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Comparar os laudos anatomopatológicos com a epidemiologia pela análise de dados clínicos do prontuário, contrapondo os fatores de risco.
- 2 Comparar os níveis de expressão gênica por qRT-PCR e proteica por imuno-citoquímica em tumores benignos e malignos de ovário e ovários normais, obtidos pelo esfregaço cérvico-vaginal.
- 3 Realizar ensaio global de expressão gênica a fim de encontrar os genes diferencialmente expressos da via WNT nos casos tumorais, e poder relacioná-los com os dados acima citados.

3 CASUÍSTICA

3.1 PACIENTES E ESPÉCIMES

Foi realizado um estudo exploratório prospectivo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº 2008/15 -1.051.013) (Anexo 1), pela técnica de amostragem não aleatória de conveniência consecutiva, onde foram coletadas amostras de citologia líquida de pacientes nos anos de 2016 e 2017, realizadas no centro cirúrgico. Pela rotina cirúrgica já conhecida, esperava-se obter cerca de 45 participantes com tumores malignos, 75 com tumores benignos e 50 com ovários sem alterações. Esse número poderia variar com a frequência de cirurgias e laudos histológicos. A confirmação diagnóstica foi realizada pela análise de coloração por hematoxilina-eosina (H&E) por um patologista experiente da instituição. Ao final, foram coletadas amostras de 101 participantes. Baseados nos critérios de exclusão, 12 amostras foram excluídas e permaneceram no estudo 22 tumores epiteliais malignos, 32 casos benignos com diagnóstico de teratoma, cistoadenoma, fibrotecoma e fibroma, e 35 casos sem alterações ovarianas, os quais tiveram diagnóstico de miomas uterinos, hidrossalpinge, castração, cistos e pólipos.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas (critérios de inclusão) as pacientes admitidas no Hospital AC Camargo, submetidas à laparotomia ou laparoscopia exploratória devido à massa anexial. O diagnóstico histopatológico posterior aos procedimentos permitiu a seleção das pacientes diagnosticadas com tumor ovariano maligno do tipo epitelial, tumores benignos e ovários com ausência de neoplasias. Os critérios de inclusão não eram restritos a idade nem localização geográfica de moradia.

Os critérios de exclusão adotados foram: pacientes laqueadas, aquelas com tumores pélvicos (como câncer de útero, endométrio, vagina, reto, bexiga e vulva) tanto diagnosticadas anteriormente ou após as coletas. Também foram excluídos os casos que não apresentaram material suficiente na coleta, que não geraram dados moleculares e citológicos após coleta, que não apresentaram informações clínicas compatíveis com o estudo, bem como pacientes que se recusarem a participar do estudo.

A estratégia utilizada neste estudo não apresentou desconforto ou risco para as pacientes.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Anteriormente à coleta, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Após preenchimento do TCLE e autorização das pacientes, foi realizada coleta de esfregaço citológico pelo método de swab. A coleta de amostras do colo uterino foi realizada no pré-operatório imediato, logo após a realização da anestesia. Estas amostras foram coletadas e armazenadas em um frasco de citologia líquida com conservante celular ThinPrep® (Hologic, Inc. Marlborough, MA, EUA) adequado para citologia oncótica. Outro frasco, do tipo eppendorf livre de DNase (volume de 1,5mL) contendo o reagente Cell Protect (Qiagen Cat No./ID: 76526) foi utilizado para acondicionar as amostras para fins de análise molecular. Foram então consultados os exames anatomopatológicos a fim de avaliar se a massa anexial era resultante de tumor benigno ou maligno (câncer de ovário). Em seguida, a casuística foi dividida em três grupos, normais sem alterações neoplásicas ovarianas, tumores benignos e tumores malignos, o que consideramos como progressão neoplásica para base da comparação estatística. Estes grupos amostrais foram analisados por análise imuno-citoquímica e métodos moleculares para os marcadores WNT5a e WNT7a. O material foi armazenado em frasco apropriado, para posterior processamento dos experimentos.

Os prontuários foram revisados e dados como tabagismo, histórico familiar, etilismo, tumores não pélvicos anteriores à coleta, número de filhos e uso de anticoncepcional foram registrados para estabelecer possíveis fatores de risco ou de proteção.

4.2 PREPARAÇÃO DE LÂMINAS

O material líquido contendo conservante PreservCyt a base de metanol, foi processado no equipamento ThinPrep 2000 (Hologic) a fim de obter um *pellet* celular. Esta estratégia permite a concentração celular máxima para preparação das lâminas e subseqüente ensaios de imunocitoquímica. O processamento pelo equipamento ThinPrep utiliza a dispersão celular de um cilindro com um filtro de policarbonato neutro, fino e poroso, que roda sobre si mesmo, separando ao acaso grupos aderentes e dispersando muco cervical e sangue. Posteriormente, as células aderem ao filtro num plano sendo então transferidas para as lâminas. A principal vantagem do método ThinPrep é a preservação celular e a menor perda do material, além de aumentar a sensibilidade e ser um método de monocamada, usado não somente para citologia. As amostras coletadas de biópsia e em blocos de parafina resultantes dos procedimentos de rotina foram cedidas para a confecção de lâminas e posterior raspagem para o protocolo do ensaio de expressão gênica global de transcritos.

4.3 IMUNO-CITOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os procedimentos de imuno-citoquímica e histologia foram realizados no *Core Facility* de Histologia-IHQ-TMA do A.C.Camargo Cancer Center.

A marcação das lâminas citológicas com o anti-WNT5A (diluição, 1:500; catalogo no. MA515511; Thermo Fisher Scientific, DE, EUA) foi feita utilizando o kit de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). As reações foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o anticorpo foi transferido com o diluente (ab64211, Abcam) para o dispensador apropriado do equipamento para uso automatizado. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 32 min a 37°C. Posteriormente foi utilizado o kit de detecção, que consiste na aplicação do inibidor por 4 min a 37°C, seguido do uso do multímero por 12 min, do DAB/peroxidase por 8 min e solução Cooper por 4 min. Em seguida, os cortes foram contra corados com os reagentes Hematoxilina II (cat. 790-2208, Ventana Medical Systems, Inc.) por 8 min a 37°C e Bluing (cat. 760-203, Ventana Medical Systems, Inc.) por 4 min. Foi utilizando também o anticorpo WNT7A (diluição, 1:100; catalogo no. PA5-34328; Thermo Fisher) foi utilizado o OptiView DAB IHC Detection Kit (cat. 760-700, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) e incluída uma etapa adicional com a incubação de um multímero entre a incubação do anticorpo e do DAB com objetivo de intensificar a amplificação do sinal. O anticorpo foi incubado por 2h a 37°C. Após o ensaio de imuno-citoquímica,

as lâminas foram montadas em Entellan (cat. 107961, Merck). Os protocolos dos anticorpos Invitrogen – Thermo Fischer estão disponíveis para tecidos parafinados e foram adaptados para a citologia. Para validação dos anticorpos, os controles histológicos usados foram tecidos de cérebro para WNT5a e para WNT7a, seguindo recomendação do fabricante dos anticorpos. A padronização da diluição foi realizada tanto em tecido histológico de controle citado acima como em lâminas citológicas de Papanicolaou. O mesmo protocolo acima foi utilizado para a imunohistoquímica, com inclusão da etapa de desparafinização com EZ Prep e recuperação antigênica de 60 minutos para WNT7a e 30 minutos para WNT5a. O anticorpo WNT7a foi diluído em 1:100 e incubado por 60 minutos, enquanto o anticorpo WNT5a diluído 1:500 e incubado 60 minutos.

Em seguida, as lâminas foram observadas ao microscópio no aumento de 80x e 200x, para análise do desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, como produto final da reação. A marcação foi classificada pela intensidade da coloração: inespecífica (0), ausente (1), leve (2), moderada (3) e intensa (4), como descrito em literatura (BRUMMER et al. 2002; SHEU et al. 2003; BELHOCINE et al. 2010). As imagens foram capturadas utilizando o software Aperio ImageScope (v12.3.2.8013 – Leica Biosystems, Wetzlar - Alemanha).

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA – CITOLOGIA LÍQUIDA

O material de citologia líquida coletado no centro cirúrgico foi armazenado à temperatura ambiente e depois encaminhado para o Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center para processamento (OLIVIERI et al. 2013). As amostras foram pré-processadas e transferidas para microtubos de 1,5ml para recuperação do pellet de células. O protocolo de extração de RNA foi conduzido de acordo com o POP (protocolo operacional padrão) interno criado pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center para esta finalidade. Antes do procedimento de extração do RNA, a amostra foi tratada com a enzima DNase (Qiagen, CA, EUA) e então homogeneizada com tampão de lise e β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich Corporation). A purificação do RNA foi realizada utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações de acordo com o POP interno. A pureza e concentração do RNA foram avaliadas nos equipamentos Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Fisher) e Qubit QUANT-IT RNA BR assay kit (Thermo Fisher), respectivamente. A integridade foi determinada utilizando o equipamento Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, EUA). O TapeStation gera uma nota de qualidade do RNA que vai de 0-10, sendo 10 o RNA na sua forma mais íntegra.

4.5 REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Foi obtido o cDNA na quantidade usada de 1000ng para um volume final de 20 μ L utilizando a metodologia *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA, Cat. N $^{\circ}$ 4368814/ 4374966), seguindo especificações do fabricante. Os genes] *WNT5A* e o *WNT7A* – TaqMan Gene Expression Assay (Qiagen, Cat.n $^{\circ}$ 4331182/4453320, FAM-MGB 20x). Após a transcrição reversa, as amostras foram diluídas com água pura estéril para atingir uma concentração final de aproximadamente 2ng/ μ L e estocadas a -20 $^{\circ}$ C. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystem) utilizado o sistema de detecção *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. Para o cálculo da QR (quantificação relativa) foi usado o método de Livak descrito pela equação $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ endógeno}$ e $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ amostra} - \Delta CT \text{ calibrador}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). Os iniciadores da reação (conjunto de *primers*) foram inventariados pela Applied Biosystems, para cada gene alvo a ser investigado. Como controle endógeno foi utilizado ACTB (*β -actina*) e um pool de amostras normais foi utilizado para normalizar a reação. Foram adicionados 10ng de cada amostra (volume de 5 μ L equivalente a concentração de 2ng/ μ L) em 15 μ L de MIX para volume final de 20 μ L por poço. Para leitura da placa foi utilizado o programa SDS 2.3 no equipamento

7.900HT (Applied Biosystems). Foi considerada expressão aumentada valores ≥ 2 , normal 0,5-2,0 e diminuída $\leq 0,5$.

4.6 ENSAIO DE EXPRESSÃO GLOBAL DE TRANSCRITOS

Para a comparação da expressão gênica das amostras citológicas líquidas e análise de quais componentes da via WNT estariam alterados, foi realizado um perfil de expressão gênica nas amostras de tecido parafinado normais, benignas e tumorais de ovário de 18 pacientes selecionadas a fim de verificar quais os genes diferencialmente expressos. Foi utilizado o kit de amplificação GeneChip® WT Pico Reagent Kit ((Affymetrix/ThermoFisher, EUA) capaz de avaliar o transcriptoma total a partir de quantidades muito pequenas de RNA, assim como de amostras degradadas, como os FFPE (*Formalin-fixed, Paraffin-embedded*).

A extração do RNA foi realizada usando o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion/ThermoFisher, AM1975) para tecidos FFPE, de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada usando o NanoDrop (Thermo Fisher) e o RNA foi quantificado usando o Qubit (Thermo Fisher) processado de acordo com o protocolo do fabricante. Para a transcrição reversa, o RNA total foi amplificado com iniciadores contendo uma sequência promotora, na etapa First Strand cDNA onde 5 μ L de RNA foi transferido para tubo contendo 5 μ L de First Strand Master Mix e incubados conforme protocolo. Como molde para o cDNA de fita simples, foi utilizado 8 μ L do Adaptor 3', para a síntese do cDNA de

cadeia dupla em um ciclo de 15 min a 15°C, 15 min a 35°C, 10 min a 70°C e 2 min a 4°C, seguido de 30µL do WT Pico PCR em ciclo de 2 min a 95°C, 7 ciclos por 30 seg a 94°C, 5 min a 70°C, e 2 min a 4°C, etapa que utiliza DNA Taq polimerase e iniciadores adaptadores específicos para sintetizar e pré-amplificar o cDNA. Para a síntese de cRNA por IVT (*in vitro transcription*) foram adicionados 30µL do WT Pico IVT. Nesta etapa o RNA anti-sense é sintetizado e amplificado por modelo de cDNA de cadeia dupla usando Polimerase de RNA T7. Esta reação foi incubada por 14 horas a 40°C, e posteriormente a 4°C. A purificação do cRNA foi feita usando beads magnéticas em lavagens seriadas com etanol 80% e ressuspendido em 27µL de água livre de nucleases a 65°C. Para a síntese do fita sense do cDNA por transcrição reversa foram adicionados 16 µL do mix de WT Pico 2nd-Cycle contendo iniciadores específicos em 24 µL de cRNA na concentração de 20µg, incubados por 10 min a 25°C, 90 min a 42°C, 10 min a 70°C e 2 min a 4°C. Em seguida, foram adicionados 4µL de RNase H para hidrolisar o molde de cRNA deixando a fita simples de cDNA, em um ciclo de 45 min a 37°C, 5 min a 95°C e 2 min a 4°C. Após a hidrólise, o cDNA de cadeia simples do 2º ciclo foi purificado por meio de um mix de beads de purificação incluindo lavagens seriadas com etanol 80% e 100% e também 30µL de água livre de nucleases a 65°C, para remover enzimas, sais e dNTPs não incorporados. Um total de 5.5µg de ss-cDNA foi utilizado para fragmentação e marcação das regiões terminais com biotina, feitas com incubação das amostras adicionadas de 14µL do master mix de WT Pico Fragmentation and Labeling Buffer and Enzyme incubadas por 60 min a

37°C, 2 minutos a 93°C e 2 minutos a 4°C. Este procedimento em sua totalidade é o recomendado pelo fornecedor da plataforma de arrays.

Como controle positivo foi usado RNA de linhagem HeLa fornecida pelo fabricante. A hibridação foi realizada no chip Clariom D em forno por 16 horas à 60rpm e 47°C, sendo os chips relevados e lavados no equipamento automatizado GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix/ThermoFisher Pub. No. 08-0295), segundo o protocolo Expression Wash, Stain and Scan User Manual for Cartridge Arrays (P/N 702731 Rev. 4). O escaneamento foi realizado no Affymetrix GeneChip Scanner 7000 (Affymetrix/ThermoFisher). Após escaneamento foram gerados os arquivos CEL. de cada amostra pelo AGCC (Affymetrix GeneChip Command Console Software) e analisados pelo programa TAC (Transcriptome Analysis Console 4.0). Para comparação entre os grupos e identificação de *Fold Change* (FC) e P valor foi utilizado o pacote Limma e o pacote ComplexHeatmap utilizado para construir os heatmaps. Os genes diferencialmente expressos (DE) foram selecionados pela significância quando $p < 0.05$ com $FC > 2$ e < -2 representando a diferença entre os grupos e foram selecionados usando a plataforma online Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG (<https://bit.ly/2GVe8ry>) que possui uma coleção de catálogos de genes para todos os genomas completos que são gerados a partir de recursos públicos disponíveis como o NCBI RefSeq e GenBank.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva onde foram apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas, e as principais variáveis quantitativas como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo. Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas e a correlação entre os marcadores, nível de expressão dos transcritos e das proteínas, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher ($p < 0,05$), quando apropriado. Na avaliação da concordância entre os genes *WNT5A* e *WNT7A* e das proteínas entre si, foi utilizado o coeficiente de Kappa.

Para avaliar possíveis fatores de risco para o câncer de ovário, foi utilizada a Regressão Logística, em que foram avaliados os valores das OR (*odds ratio*). O nível de significância adotado foi o de 5%. Desta forma os testes foram considerados como significativos quando apresentarem valor de $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS versão 25.

Foi utilizado o método ANOVA para comparar os grupos de amostras que apresentaram genes diferencialmente expressos resultantes da análise de expressão global dos transcritos. Os genes significativos dos três grupos (ANOVA) e entre pares (Tumor vs Benigno, Tumor vs Normal e Benigno vs Normal) foram selecionados quando $p < 0.05$ com *fold-change* (FC) > 2 e < -2 . Para avaliar a distribuição e heterogeneidade dos genes em relação aos

grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney onde o valor de significância adotado foi $p < 0.05$.

Foram criados box plots para avaliação da variabilidade de cada transcrito diferencialmente expresso, onde a linha preta reta seccionando o retângulo mostra o valor da mediana e as semirretas (bordas do retângulo) ligam respectivamente os quartis mínimo e máximo. Os pontos acima do gráfico e os asteriscos abaixo representam os outliers. O valor mínimo e o máximo são mostrados pelas linhas retas externas ao retângulo e mostram a amplitude dos dados, que quanto maior mais amplo são os resultados. Esses dados mínimos e máximos mostram a variabilidade de cada gene entre cada grupo.

Por fim, para avaliar a correlação entre os genes alvos *WNT5A* e *WNT7A* com os genes diferencialmente expressos encontrados no transcriptoma, foi utilizado o teste de Spearman não paramétrico indicando forte associação positiva quando igual a 1 e forte associação negativa quando igual a -1, com significância de $p < 0.05$ para ambos os casos.

5 RESULTADOS

5.1 EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA

A Tabela 1 apresenta alguns fatores epidemiológicos coletados do prontuário médico.

Em relação ao hábito tabagista, 24,7% dos prontuários não possuíam informações preenchidas, e dentre os dados válidos apenas 28,3% dos casos eram de pacientes que foram fumantes ou eram fumantes no momento da consulta. Esses números aumentam quando se trata de etilismo pois 37,1% dos prontuários não possuíam informações e dentre os dados válidos 41,1% das pacientes relataram beber socialmente ou intensamente e 58,9% relataram não fazerem uso de bebida alcoólica nem socialmente. O número de filhos foi omitido apenas em 7,1% dos prontuários e entre os dados válidos, 40,2% das pacientes não possuíam filhos ou ficaram grávidas. Os dados sobre o uso de anticoncepcional oral (ACO) não estava presente em 19,1% dos prontuários e dentre os dados válidos 47,2% relataram estarem em uso de ACO ou já terem usado. A minoria das pacientes, 18%, possuía ou relatou algum outro tipo tumoral não ginecológico no momento da pesquisa ou no passado, respectivamente.

Tabela 1 - Descritiva dos dados epidemiológicos segundo variáveis sociais como número de filhos e variáveis que expressam estilo de vida como tabagismo, etilismo, uso de anticoncepcional oral, bem como diagnóstico de tumores não ginecológicos anteriores ao estudo, dados coletados no A.C.Camargo Cancer Center, 2018.

Tabagismo		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida
Válido	Ex fumante	11	12,4	16,4
	Fumante atual	8	9,0	11,9
	Não fumante	48	53,9	71,6
	Total	67	75,3	100,0
Omisso	Sistema	22	24,7	
Total		89	100,0	

Etilismo		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida
Válido	Sim, bebe	23	25,8	41,1
	Não bebe	33	37,1	58,9
	Total	56	62,9	100,0
Omisso	Sistema	33	37,1	
Total		89	100,0	

Filhos		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida
Válido	0	33	37,1	40,2
	1	17	19,1	20,7
	2	24	27,0	29,3
	3	5	5,6	6,1
	4	2	2,2	2,4
	5	1	1,1	1,2
	Total	82	92,1	100,0
Omisso	Sistema	7	7,9	
Total		89	100,0	

ACO		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida
Válido	Sim, usa	34	38,2	47,2
	Não usa	38	42,7	52,8
	Total	72	80,9	100,0
Omisso	Sistema	17	19,1	
Total		89	100,0	

Outros tumores		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida
Válido	Sim, teve	16	18,0	18,0
	Não teve	73	82,0	82,0
Total		89	100,0	100,0

Idade		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida
Válido	Até 60 anos	73	82	82
	> 60 anos	16	18	18
Total		89	100	100

Entre 2010 a 2018, foram atendidos 1.039 casos de câncer de ovário no A.C.Camargo Cancer Center, representando 1,16% de todos os 89.228 casos diagnosticados de outras origens (Tabela 2).

Tabela 2 - Número total de casos de câncer de ovário e outros tipos tumorais, nos últimos 10 anos no hospital A.C.Camargo Cancer Center.

Ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Ovário	99	109	110	158	106	111	118	125	103
Outros	9.325	9.394	10.663	11.140	10.299	9.856	9.537	8.971	8.923
Total	9424	9503	10773	11298	10405	9967	9655	9096	9026

5.2 ENSAIO DE EXPRESSÃO GÊNICA - qRT-PCR

Para análise da expressão gênica foram comparados três grupos clínicos, os casos normais, com lesões ovarianas benignas e carcinomas de ovário. Entre as 89 pacientes incluídas no estudo, apenas 65 apresentaram resultados com qualidade satisfatória para a análise de expressão gênica par WNT5a e 62 para WNT7a, sendo excluídas outras 24 de WNT5a e 27 de WNT7a por não haver material genético em quantidade adequada.

Os níveis de expressão do gene *WNT5A* foram analisados de duas maneiras: (A) individualizando cada grupo de amostras (normais, benignas e malignas) onde foi observado um maior número de casos benignos com expressão diminuída do gene (n=15), embora sem significância estatística comparado aos demais grupos (p=0,459) (Tabela 3). (B) Os casos normais e benignos foram agrupados e comparados aos malignos (B) sendo verificado

um maior número de casos benignos e normais com expressão diminuída do gene (n=25), também sem significância estatística (p= 0,793).

Tabela 3 - Distribuição dos níveis de expressão gênica de *WNT5a* nos distintos grupos.

A	Expressão	Classificação de diagnóstico			Total
		Normal	Benigno	Maligno	
Gene <i>Wnt5a</i>	Diminuída	10 (43,5%)	15 (60%)	7 (41,2%)	32 (49,2%)
	Normal	11 (47,8%)	6 (24%)	7 (41,2%)	24 (36,29)
	Aumentada	2 (8,7%)	4 (16%)	3 (17,6%)	9 (13,8)
Total		23 (100%)	25 (100%)	17 (100%)	65 (100%)

p= 0,459

B	Expressão	Classificaçã de diagnóstico		Total
		Benigno/Normal	Maligno	
Gene <i>Wnt5a</i>	Diminuída	25 (52,1%)	7 (41,2%)	32 (49,2%)
	Normal	17 (35,4%)	7 (41,2%)	24 (36,29)
	Aumentada	6 (12,5%)	3 (17,6%)	9 (13,8)
Total		48 (100%)	17 (100%)	65 (100%)

p= 0,793

A: Comparação da expressão nos grupos individualizados, normal, benigno e maligno. **B:** Comparação da expressão isolando os casos tumorais.

Os níveis de expressão do gene *WNT7A* também avaliados individualizando cada grupo de amostras (A) (normal, benignos e malignos) sendo observado que os casos normais apresentaram mais frequentemente expressão diminuída do gene (n=18), embora sem significância estatística (p= 0,450) (Tabela 4). Semelhante ao descrito para *WNT5A*, também foi realizada a comparação dos níveis de expressão agrupando os casos normais e benignos e comparando-os aos malignos (B). Neste caso foi detectado um maior número de casos com expressão diminuída, sem significância estatística (n=31) (p= 0,419).

Tabela 4 - Distribuição dos níveis de expressão gênica de *WNT7a* nos distintos grupos.

A	Expressão	Classificação de diagnóstico			Total
		Normal	Benigno	Maligno	
Gene <i>Wnt7a</i>	Diminuída	18 (69,2%)	13 (52%)	6 (54,5%)	37 (59,7%)
	Normal	6 (23,1%)	8 (32%)	5 (45,5%)	19 (30,6%)
	Aumentada	2 (7,7%)	4 (16%)	0 (0%)	6 (9,7%)
Total		26 (100%)	25 (100%)	11 (100%)	62 (100%)

p= 0,450

B	Expressão	Classificação de diagnóstico		Total
		Benigno/Normal	Maligno	
Gene <i>Wnt7a</i>	Diminuída	31 (60,8%)	6 (54,5%)	37 (59,7%)
	Normal	14 (27,5%)	5 (45,5%)	19 (30,6%)
	Aumentada	6 (11,8%)	0 (0%)	6 (9,7%)
Total		51 (100%)	11 (100%)	62 (100%)

p=0,419

A: Comparação da expressão nos grupos individualizados, normal, benigno e maligno (p=0,450). **B:** Comparação da expressão isolando os casos tumorais (p=0,419).

Para avaliar a expressão do gene *WNT5a* como possível fator de risco para o câncer de ovário (Tabela 5) foram avaliados os valores das OR (*odds ratio*) sendo o nível de significância adotado de 5%. No agrupamento dos casos normais e benignos, as amostras com expressão diminuída do gene possuem 44% (*odds* 0,56) menos de chance de desenvolver tumor maligno que as amostras com expressão aumentada. Nas amostras com expressão normal há 18% (*odds* 0,82) menos de chance de desenvolver tumor maligno que as amostras com expressão aumentada, observando que o valor de p não apresentou significância estatística.

Os níveis de expressão do gene *WNT7A* também avaliados individualizando cada grupo de amostras (A) (normal, benignos e malignos) sendo observado que os casos normais apresentaram mais frequentemente expressão diminuída do gene (n=18), embora sem significância estatística (p= 0,450) (Tabela 5). Semelhante ao descrito para *WNT5A*, também foi realizada a comparação dos níveis de expressão de *WNT7a* agrupando os casos normais e benignos e comparando-os aos malignos (B). Neste caso foi detectado um maior número de casos com expressão diminuída, sem significância estatística (n=31) (p= 0,419).

Tabela 5 - Associação do risco de neoplasia com os níveis de expressão gênica de *WNT5a* e *WNT7a*.

A Risco de neoplasia maligna em relação ao gene aumentado				
Expressão de	n	Odds ratios	95%CI	p
<i>WNT5a</i>				
Diminuída	32	0,56	0,11-2,82	0,48
Normal	24	0,82	0,15-4,25	0,81
B Risco de neoplasia maligna em relação ao gene aumentado				
Expressão de	n	Odds ratios	95%CI	p
<i>WNT7a</i>				
Diminuída	37	-	0	0,999
Normal	19	-	0	0,999

A; casos malignos isolados dos casos normais e benignos e seu risco em relação à expressão aumentada do gene. **B**; casos malignos isolados dos casos normais e benignos onde não foi possível dados estatísticos.

A concordância entre a expressão dos dois genes testados foi avaliada pelo coeficiente Kappa (Tabela 6). O coeficiente de Kappa é utilizado para medir a concordância entre dois ou mais grupos que realizam

uma mesma análise, sendo 1 o valor de concordância e, portanto, quanto mais próximo a 1 maior concordância há entre os grupos e menor será o valor de p. Foi observado o valor de Kappa de -0,032 ($p=0,772$).

Tabela 6 - Tabela cruzada de distribuição entre os genes *WNT5a* e *WNT7a* e o nível de concordância entre a expressão gênica.

Expressão		Gene <i>WNT7a</i>			Total
		Diminuída	Normal	Aumentada	
Gene <i>WNT5a</i>	Diminuída	16 (50%)	8 (50%)	3 (75%)	27 (51,9%)
	Normal	12 (37,5%)	6 (37,5%)	1 (25%)	19 (36,5%)
	Aumentada	4 (12,5%)	2 (12,5%)	0 (0%)	6 (11,5%)
Total		32 (100%)	16 (100%)	4 (100%)	52 (100%)

$p= 0,772$

Distribuição das amostras em relação ao nível de expressão gênica.

5.3 ANÁLISE DOS DADOS DE IMUNO-CITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

A marcação da expressão da proteína WNT5A teve avaliação baseada na intensidade da marcação e foi dividida em marcação inespecífica, ausente, leve, moderada ou intensa. As marcações com granulações, fundo e artefatos corados foram consideradas como inespecíficas para evitar erro de especificidade e resultados falsos positivos. As lâminas em que as células não apresentavam coloração alguma, mesmo que presente algum artefato, foram consideradas como marcações ausentes (Figura 2). Os mesmos critérios foram utilizados tanto para as lâminas citológicas, como para os controles e lâminas histológicas. A coloração da

marcação foi realizada por análise qualitativa, pois o equipamento é capaz de quantificar celularidade marcada de lâminas específicas teciduais FPPE.

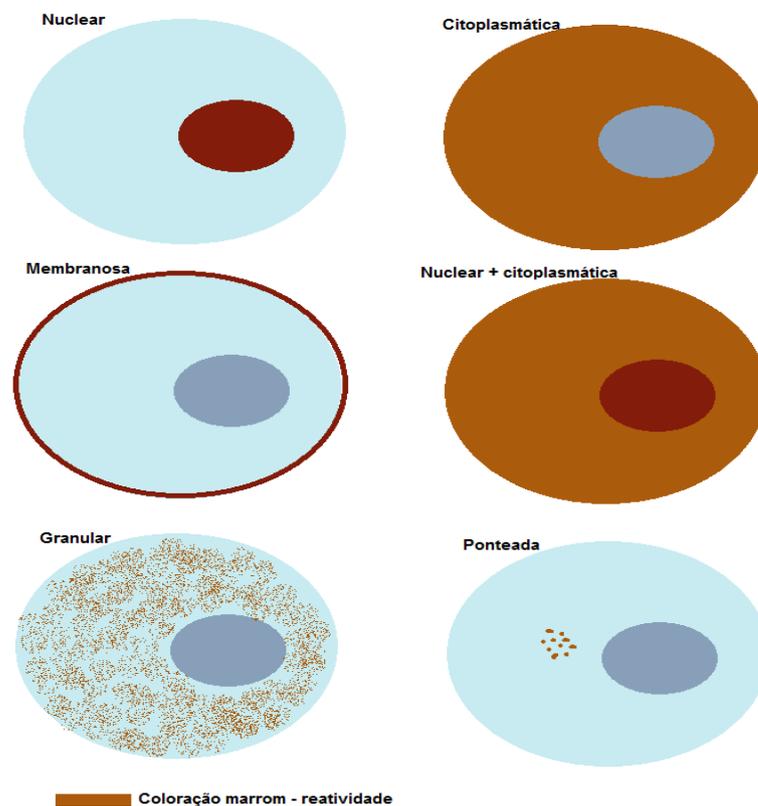


Figura 2 - Ilustração dos diferentes tipos de marcações celulares utilizados nas análises de Imunocitoquímica, a depender do tipo de antígeno e da marcação alvo do anticorpo.

A Tabela 7 apresenta a distribuição geral da marcação por imunocitoquímica nos diferentes conjuntos de amostras, onde assim como na expressão gênica, foram separados por duas condições, a primeira (A) individualizando cada grupo de casos (normais, benignos e malignos) afim de investigar o perfil de expressão em cada variável. Esta análise resultou um valor de $p=0,084$. Em (B) encontra-se a comparação da marcação

agrupando os casos normais e benignos separando-os dos malignos ($p=0,999$).

Tabela 7 - Distribuição dos níveis de expressão proteica de WNT5a nos distintos grupos.

A		Classificação de diagnóstico			
Marcação		Normal	Benigno	Maligno	Total
Proteína WNT5a	Inespecífica	13 (43,3%)	9 (29%)	3 (17,6%)	25 (32,1%)
	Ausente	4 (13,3%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (5,1%)
	Leve	9 (30%)	16 (51,6%)	10 (58,8%)	35 (44,9%)
	Moderada ou intensa	4 (13,3%)	6 (19,4%)	4 (23,5%)	14 (17,9%)
Total		30 (100%)	31 (100%)	17 (100%)	78 (100%)
$p= 0,084$					
B		Classificação OVÁRIO			
Marcação		Benigno/Normal	Maligno	Total	
Proteína WNT5a	Inespecífica, ausente e leve	51 (83,6%)	13 (76,5%)	64 (82,1%)	
	Moderada ou intensa	10 (16,4%)	4 (23,5%)	14 (17,9%)	
	Total	61 (100%)	17 (100%)	78 (100%)	
$p= 0,999$					

A: Comparação da expressão nos grupos individualizados, normal, benigno e maligno ($p=0,084$). **B:** Comparação da expressão isolando os casos tumorais ($p=0,999$).

A marcação da proteína WNT5A também foi avaliada em relação a sua razão de chance de contribuir para o desenvolvimento neoplásico (Tabela 8). Novamente, foram avaliados os valores das OR e o nível de significância adotado foi de 5%. Na primeira hipótese (A) onde os casos normais e benignos foram agrupados e separados dos casos malignos a razão de chance foi 72% ($OR= 0,28$) menor da marcação inespecífica ou ausente em contribuir para o desenvolvimento maligno em relação as amostras que apresentam marcações presentes, sejam leves, moderadas ou intensas. A hipótese (A) de aumento da expressão proteica conforme progressão tumoral apresentou um ($p=0,07$) muito próximo do valor

considerado estaticamente significativo ($p < 0,05$). Na hipótese (B) quando agrupada as marcações leves, grupo considerado negativo, o valor de OR foi de 36,3% menor da marcação inespecífica, ausente ou leve em contribuir para o desenvolvimento maligno em relação as amostras que apresentam marcações presentes, sejam leves, moderadas ou intensas, no entanto o ($p = 0,5$) não foi significativo.

Tabela 8 - Associação do risco de neoplasia com os níveis de expressão proteica de WNT5a.

A Risco de neoplasia maligna em relação a presença de expressão proteica				
Expressão de WNT5a	n	Odds ratios	95%CI	p
Inespecífica ou ausente	29	0,28	0,075-1,10	0,07

B Risco de neoplasia maligna em relação a presença de expressão proteica				
Expressão de WNT5a	n	Odds ratios	95%CI	p
Inespecífica, ausente, ou leve	64	0,637	0,17-2,36	0,5

A e B; casos malignos isolados dos casos normais e benignos e a relação com o aumento da marcação proteica.

As marcações citológicas, e seus controles, foram padronizadas em diluições seriadas e definidas como adequadas em diluição 1:500. Os controles testados foram tecidos de testículo e cérebro do setor de Patologia na diluição também 1:500. O fabricante padroniza o kit para uso em lâminas histológicas parafinizadas. Na Figura 3 está representada como as colorações das marcações foram identificadas, em (A) uma marcação ausente em uma amostra normal, (B) uma marcação leve em uma amostra

benigna, (C) uma marcação moderada em uma amostra maligna e (D) uma marcação intensa em algumas células dispostas com núcleo não corado no controle de tecido cerebral.

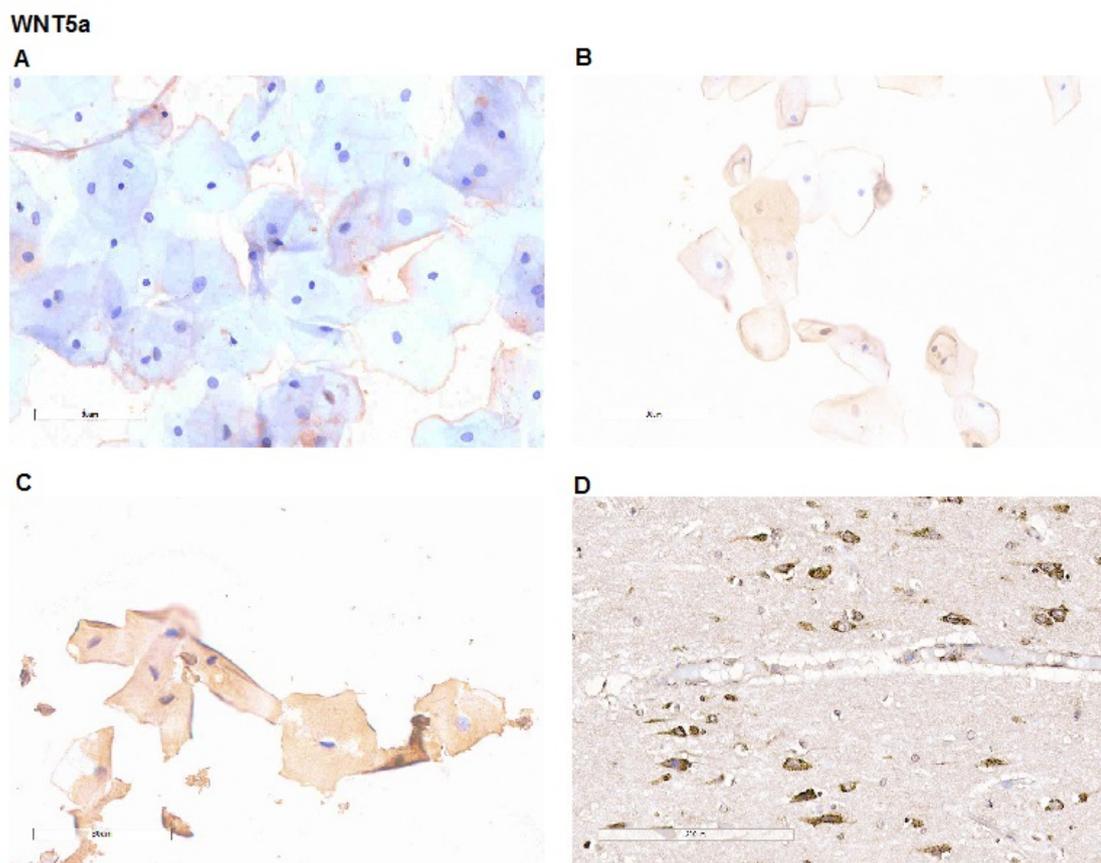


Figura 3 - Marcações proteicas de WNT5a em diferentes casos clínicos. (A); marcação ausente em amostra normal. (B) marcação leve em amostra benigna. (C): marcação moderada em amostra maligna. (D): marcação intensa em algumas células dispostas em controle de cérebro. 80x.

A proteína WNT7a também teve sua marcação dividida em marcação inespecífica, ausente, leve, moderada ou intensa. Na Tabela 9 é possível observar a marcação nos diferentes grupos clínicos. O nível de expressão proteica comparada aos casos individualizados (A) apresentou valor de ($p=0,252$). Abaixo (B) encontra-se a comparação da marcação agrupando os

casos normais e benignos separando-os dos malignos onde o valor de ($p=0,999$).

Tabela 9 - Distribuição dos níveis de expressão proteica de WNT7a nos distintos grupos.

A	Marcação	Classificação OVÁRIO			Total
		Normal	Benigno	Maligno	
Proteína WNT7a	Inespecífica	2 (11,8%)	2 (11,8%)	3 (25%)	7 (15,2%)
	Ausente	8 (47,1%)	3 (17,6%)	1 (8,3%)	12 (26,1%)
	Leve	3 (17,6%)	8 (47,1%)	5 (41,7%)	16 (34,8%)
	Moderada ou intensa	4 (23,5%)	4 (23,5%)	3 (25%)	11 (23,9%)
Total		17 (100%)	17 (100%)	12 (100%)	46 (100%)

$p= 0,252$

B	Marcação	Classificação OVÁRIO		
		Benigno/Normal	Maligno	Total
Proteína WNT7a	Inespecífica, ausente e leve	26 (75,5%)	9 (75%)	35 (76,1%)
	Moderada ou intensa	8 (23,5%)	3 (25%)	11 (23,9%)
	Total	34 (100%)	12 (100%)	46 (100%)

$p= 0,999$

A: Comparação da expressão nos grupos individualizados, normal, benigno e maligno. **B:** Comparação da expressão isolando os casos tumorais.

A razão de chance dos níveis de expressão da proteína de WNT7a contribuir para o desenvolvimento neoplásico está representada na Tabela 10. Na hipótese (A) onde os casos normais e benignos foram agrupados e separados dos casos malignos a razão de chance foi 37% (*odds* 0,63) menor da marcação inespecífica ou ausente em contribuir para o desenvolvimento maligno em relação as amostras que apresentam marcações presentes, sejam leves, moderadas ou intensas. Essa hipótese não apresentou significância estatística. Na hipótese (B) os casos normais e benignos também foram agrupados e separados dos casos malignos, porém cruzados com as marcações inespecíficas, ausentes e leves, onde a razão

de chance foi 7,7% (*odds* 0,923) menor dessas marcações em contribuir para o desenvolvimento maligno em relação as amostras que apresentam marcações moderadas ou intensas, não mostrando diferença significativa entre as marcações.

Tabela 10 - Associação do risco de neoplasia com os níveis de expressão proteica de WNT7a.

A Risco de neoplasia maligna em relação a presença de expressão proteica				
Expressão de WNT7a	n	<i>Odds ratios</i>	95%CI	p
Inespecífica ou ausente	19	0,63	0,16-2,51	0,51
B Risco de neoplasia maligna em relação a presença de expressão proteica				
Expressão de WNT7a	n	<i>Odds ratios</i>	95%CI	p
Inespecífica, ausente, ou leve	35	0,923	0,20-4,25	0,91

A; casos malignos isolados dos casos normais e benignos e a relação com o aumento da marcação proteica. **B**: agrupamento dos casos benignos/malignos e sua relação com o aumento da marcação proteica.

Para a proteína WNT7a as padronizações em diluições seriadas foram testadas e definidas como adequadas em diluição 1:100 tanto para as amostras como para os controles, testados em tecidos de testículo e cérebro do setor de Patologia. Na Figura 4 é possível visualizar uma marcação ausente em uma amostra normal (A), uma marcação leve em uma amostra benigna (B), uma marcação intensa em uma amostra maligna (C), e uma marcação intensa também no tecido cerebral como controle. Assim como em

WNT5a, a progressão da marcação não foi presente em todas as amostras conforme progressão do diagnóstico.

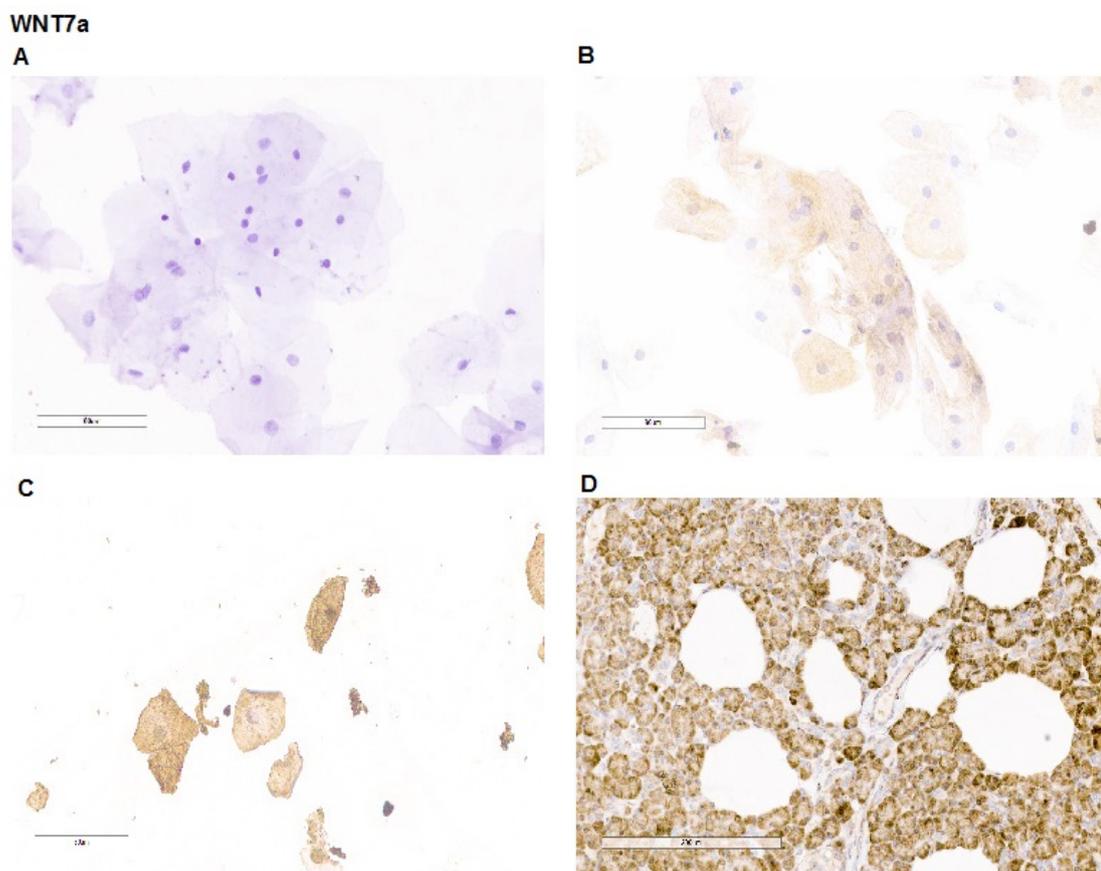


Figura 4 - Marcações proteicas de WNT7a em diferentes casos clínicos. **(A)**; marcação ausente em amostra normal. **(B)** marcação leve em amostra benigna. **(C)**: marcação intensa em amostra maligna. **(D)**: marcação intensa em algumas células dispostas em controle de pâncreas. 80x.

O nível de concordância entre as proteínas (Tabela 11) também foi calculado pelo coeficiente de Kappa. O valor de Kappa foi de 0,178 e $p=0,020$ para todas as variáveis isoladas (A). Nesta análise, é possível observar uma concordância fraca (entre 0 e 0,2 segundo referência de Kappa) entre a expressão da proteína WNT5A com a expressão da proteína

WNT7A, com diferença estatisticamente significativa. Em (B) onde foram agrupados os grupos que caracterizaram marcação negativa (inespecífica, ausente e leve) versus marcação positiva (moderada e intensa), o valor de concordância foi 0,273 com $p=0,310$, portanto, não significativo.

Tabela 11 - Tabela cruzada de distribuição entre as marcações das proteínas WNT5a e WNT7a e o nível de concordância entre a expressão proteica, em amostras citológicas.

A	Marcação	Proteína WNT7a				Total
		Inespecífica	Ausente	Leve	Moderada ou intensa	
Proteína WNT5a	Inespecífica	3 (50%)	6 (50%)	3 (18,8%)	2 (18,2%)	14 (31,1%)
	Ausente	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,2%)
	Leve	2 (33,3%)	5 (41,7%)	11 (68,8%)	6 (54,5%)	24 (53,5%)
	Moderada ou Intensa	1 (16,7%)	0 (0%)	2 (12,5%)	3 (27,3%)	6 (13,3%)
Total		6 (100%)	12 (100%)	16 (100%)	11 (100%)	45 (100%)

$p= 0,020$

B	Marcação	Proteína WNT7a		Total
		Inespecífica, ausente ou leve	Moderada ou intensa	
Proteína WNT5a	Inespecífica, ausente e leve	3 (50%)	6 (50%)	9 (75%)
	Moderada ou Intensa	1 (16,7%)	0 (0%)	3 (25%)
Total		6 (100%)	12 (100%)	12 (100%)

$p=0,310$

A; marcações individualizadas entre as proteínas. **B**: agrupamento das marcações negativas e positivas entre as proteínas.

Algumas amostras, mostradas a seguir, foram selecionadas para passarem por imuno-histoquímica nos tecidos FPPE para comparação entre as técnicas de imuno-citoquímica e imunohistoquímica, sendo essas mesmas amostras também as selecionadas para a expressão global de transcritos. A coloração da marcação também foi realizada por análise qualitativa. A expressão de WNT5A em histologia (Figura 5) dos 4 casos

malignos apresentaram marcação intensa, um dos três casos benignos apresentou marcação leve e dois apresentaram marcação moderada, e por fim o único caso normal selecionado apresentou marcação leve.

WNT5a

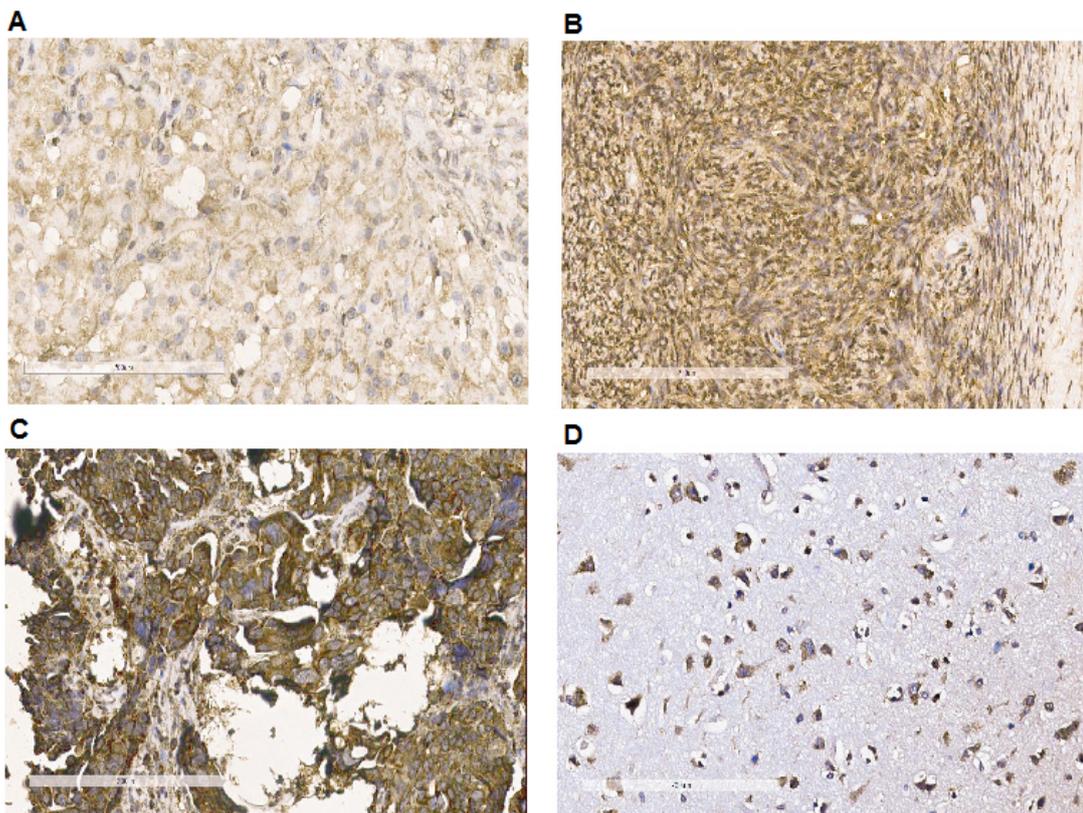


Figura 5 - Marcações proteicas de WNT5a em diferentes casos clínicos de histopatologia FPPE. **(A)** marcação leve em tecido normal. **(B)** marcação moderada em amostra benigna. **(C)**: marcação intensa em amostra maligna. **(D)**: marcação moderada em células do controle normal de cérebro. 200x.

A expressão da proteína WNT7A por imunohistoquímica (Figura 6) dos dois carcinomas de ovário mostrou um deles com marcação leve e outro moderada; entre os dois casos benignos um apresentou marcação leve e

outra marcação ausente. Entre os dois casos normais, um apresentou marcação leve e o outro ausente.

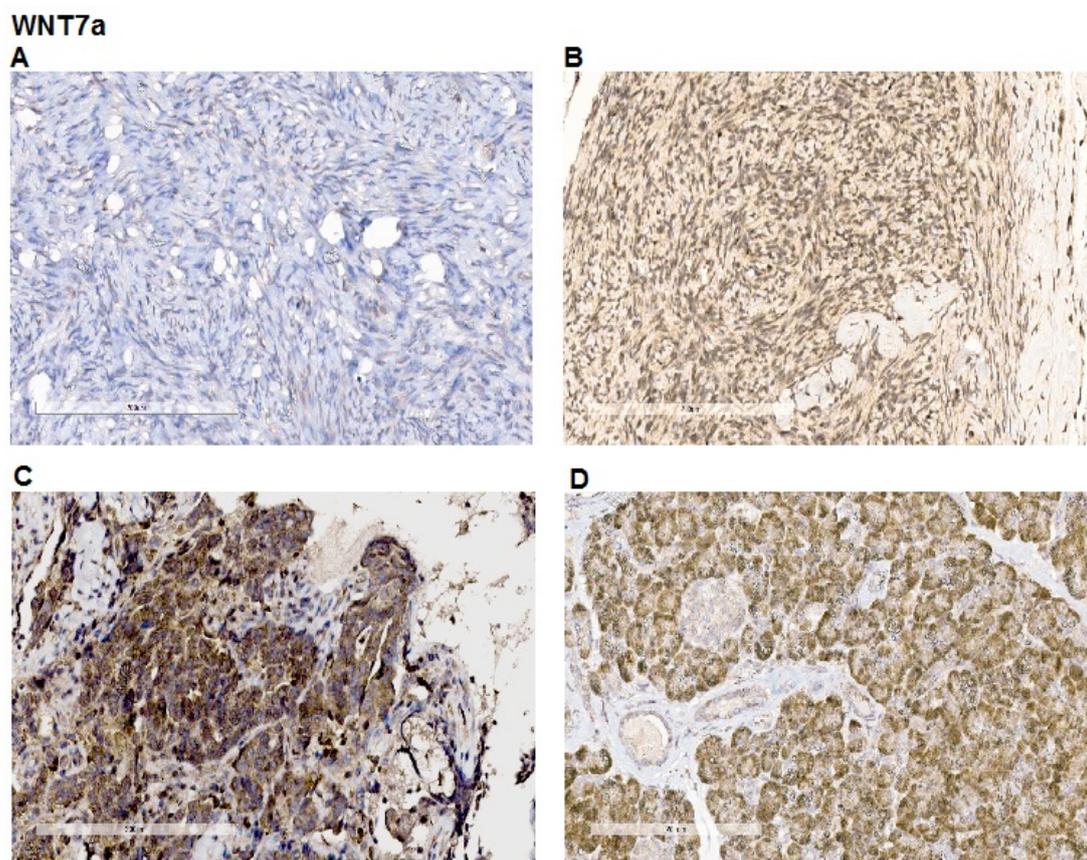


Figura 6 - Marcações proteicas de WNT7a em diferentes casos clínicos de histopatologia FPPE. **(A)** marcação ausente em tecido normal. **(B)** marcação leve em tecido benigno. **(C)**: marcação intensa em amostra maligna. **(D)**: marcação moderada em controle normal de pâncreas. 200x.

A concordância entre os resultados da expressão das proteínas pelas técnicas de imuno-citoquímica e imunohistoquímica foi testada pelo coeficiente Kappa (Tabela 12). (A) Para WNT5A o valor de Kappa foi (0,200) sugerindo uma concordância fraca entre as duas técnicas ($p=0,346$). (B) O

valor de Kappa não pôde ser calculado para WNT7A porque esta proteína em histologia se apresentou como uma variável constante.

Devido ao baixo número amostral usado imuno-histoquímica, é pouco assertivo avaliar e tomar conclusões apenas em face desses resultados.

Tabela 12 - Tabela cruzada entre as marcações das proteínas WNT5a e WNT7a e o nível de concordância entra as técnicas de imuno-citoquímica e imuno-histoquímica.

A		Proteína WNT5a HISTOLOGIA		Total
		Marcação inespecífica, ausente ou leve	Marcação moderada ou intensa	
Proteína WNT5a CITOLOGIA	Marcação inespecífica, ausente ou leve	2 (100%)	4 (66,7%)	6 (75%)
	Marcação moderada ou intensa	0 (0%)	2 (33,3%)	2(25%)
Total		2 (100%)	6 (100%)	8 (100%)

B		Proteína WNT7a HISTOLOGIA		Total
		Marcação inespecífica, ausente ou leve		
Proteína WNT7a CITOLOGIA	Marcação inespecífica, ausente ou leve	2 (40%)		2 (40%)
	Marcação moderada ou intensa	3 (60%)		3 (60%)
Total		5 (100%)		5 (100%)

Número de casos correlacionados entre expressão da proteína WNT5a em citologia x expressão da proteína WNT5a (A) em histologia com valor de Kappa (0,130) e (p=,433) (B) mesma análise para a proteína WNT7a avaliada em amostras citológicas e em FFPE. Os valores estatísticos não foram apresentados.

5.4 EPIDEMIOLOGIA ASSOCIADA AO DIAGNÓSTICO

Os prontuários foram revisados a fim de encontrar todos os dados clínicos referente à hábitos de vida ou condições de saúde que pudessem se destacar como fatores de risco ou fatores de proteção ao câncer de ovário, e os dados encontrados se resumiam a tabagismo, etilismo, número de filhos, uso de contraceptivo e diagnóstico prévios de outros tumores. Todos os critérios mencionados foram correlacionados com as condições clínicas (Tabela 13) divididas em duas hipóteses; (A) a primeira individualizando os casos em normais, benignos e malignos e a segunda hipótese agrupando os normais com benignos e separando-os dos casos malignos, a fim de observarmos qual das hipóteses poderiam mostrar um aumento de associação com fatores de risco de proteção em comparação com a literatura.

Tabela 13 - Representação estatística da associação dos dados clínicos e sociológico com o diagnóstico.

A		Associação diagnóstica x fatores de risco			
		Normal ≠ Benigno ≠ Maligno		Normal/Benigno ≠ Maligno	
		p		p	
Dado clínico	Tabagismo	0,434		0,234	
	Etilismo	0,701		1,000	
	Filhos	0,658		0,448	
	Contraceptivo	0,793		0,586	
	Outros tumores	0,068		0,049	
	Idade > 60 anos	0,472		0,530	

B		Razão de chance de desenvolvimento maligno					
		Normal/Benigno ≠ Maligno			Normal ≠ Benigno/Maligno		
		Odds ratio	95%CI	p	Odds ratio	95%CI	p
Dado clínico	Tabagismo	2,446	0,78-7,59	0,122	1,123	0,37-3,36	0,836
	Etilismo	1,167	0,36-3,77	0,797	1,684	0,54-5,18	0,364
	Filhos	1,639	0,58-4,60	0,348	1,119	0,45-2,77	0,808
	Contraceptivo	0,636	0,21-1,88	0,415	0,833	0,32-2,15	0,707
	Outros tumores	0,165	0,020-1,33	0,091	0,313	0,10-0,95	0,042
	Idade > 60 anos	0,668	0,20-2,19	0,506	0,452	0,13-1,53	0,203

A: nível de significância do critério clínico referente a progressão tumoral. **B:** razão de chance de a paciente desenvolver neoplasias em relação às condições sociais e clínicas.

5.5 EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA ASSOCIADAS AOS FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

Os fatores epidemiológicos como hábitos de vida e condições clínicas também foram associados separadamente tanto à expressão gênica quanto à expressão proteica. Abaixo (Tabela 14) observa-se que o tabagismo não mostrou associação com a expressão dos genes e das proteínas, assim

como o etilismo e o diagnóstico prévio de outros tumores. O aumento do número de filhos não apresentou diferença significativa relacionada à expressão do gene *WNT7a* e nem da proteína *WNT7a*, no entanto apresentou um valor significativo de associação com a expressão do gene *WNT5a* ($p=0,005$) e da proteína *WNT5a* ($p=0,044$). O uso de contraceptivo ($p=0,011$) e a idade acima de 60 anos ($p=0,012$) apresentaram valores significativos apenas associados à expressão do gene *WNT5a*, porém não houve significância entre o gene *WNT7a* e entre as proteínas, em ambos os casos.

Tabela 14 - Associação entre as variáveis qualitativas e as expressões dos genes e das proteínas mostrando valor de p (significância $p<0,05$).

Associação diagnóstica x expressão gênica e proteica					
		Gene <i>Wnt5a</i>	Proteína <i>Wnt5a</i>	Gene <i>Wnt7a</i>	Proteína <i>Wnt7a</i>
		p	p	p	p
Dado clínico	Tabagismo	0,785	0,932	0,268	0,150
	Etilismo	0,912	0,701	0,748	0,385
	Aumento nº filhos	0,005	0,044	0,550	0,121
	Contraceptivo	0,011	0,311	0,382	0,788
	Outros tumores	0,999	0,857	0,710	0,731
	Idade > 60 anos	0,012	0,123	0,450	0,224

Foram utilizados os testes de Fisher e Qui-quadrado.

Comparação dos valores estatísticos dos critérios epidemiológicos vs. a expressão gênica e proteica

5.6 EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À EXPRESSÃO PROTEICA

A expressão dos genes foi associada à expressão das proteínas por imuno-citoquímica (Tabela 16). Em uma parcela dos casos as amostras onde o gene *WNT5A* apresenta expressão diminuída ou normal mostra uma marcação inespecífica a leve da proteína WNT5a. Quando o gene *WNT5A* apresenta expressão aumentada, a maior parte dos casos apresenta marcação proteica moderada a intensa embora sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,067$). Da mesma forma, as amostras onde o gene *WNT7A* tem expressão diminuída há maior correlação com a marcação ausente ou leve da proteína ($p = 0,698$).

Tabela 15 - Associação entre expressão gênica e expressão proteica por imuno-citoquímica.

A		Proteína WNT5a		
		Marcação inespecífica, ausente ou leve	Marcação moderada ou intensa	Total
Gene <i>WNT5a</i>	Diminuída	27 (55,1%)	4 (30,8%)	31 (50%)
	Normal	18 (36,7%)	5 (38,5%)	23 (37,1%)
	Aumentada	4 (8,2%)	4 (30,8%)	8 (12,9%)
Total		49 (100%)	13 (100%)	62 (100%)
p= 0,067				
B		Proteína WNT7a		
		Marcação inespecífica, ausente ou leve	Marcação moderada ou intensa	Total
Gene <i>WNT7a</i>	Diminuída	21 (70%)	6 (66,67%)	27 (69,2%)
	Normal	6 (20%)	3 (33,3%)	9 (23,1%)
	Aumentada	3 (10%)	0 (0%)	3 (7,7%)
Total		30 (100%)	9 (100%)	39 (100%)
p= 0,698				

A: correlação entre a expressão do gene *WNT5a* e as marcações da proteína WNT5a. **B:** correlação entre a expressão do gene *WNT7a* e as marcações da proteína WNT7a.

Foi comparada a expressão dos genes *WNT5A* e *WNT7A* e suas proteínas avaliadas por imuno-histoquímica (Tabela 16). As duas únicas amostras com marcação leve de *WNT5a* apresentaram resultados contraditórios, uma apresentou expressão do gene aumentada e a outra diminuída enquanto as amostras com marcações moderadas ou intensas apresentaram expressão normal, diminuída e aumentada do gene ($p=0,999$). Não foi obtido resultado estatístico entre o gene *WNT7a* e sua proteína por imuno-histoquímica, pois todas as amostras apresentaram expressão diminuída do gene.

Tabela 16 - Associação entre expressão gênica e expressão proteica por imuno-histoquímica.

Expressão		Proteína WNT5a		Total
		Marcação Leve	Marcação Moderada ou Intensa	
Gene WNT5a	Diminuída	1 (50%)	2 (33,3%)	3 (37,5%)
	Normal	0 (0%)	2 (33,3%)	2 (25%)
	Aumentada	1 (50%)	2 (33,3%)	3 (37,5%)
Total		2 (100%)	6 (100%)	8 (100%)

p= 0,999

5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GLOBAL DE TRANSCRITOS

A análise da expressão global dos transcritos foi realizada em 17 amostras categorizadas em três grupos distintos, como previamente descrito. Os grupos foram analisados individualmente e também relacionados entre Normal vs. Benigno, Benigno vs. Maligno e Normal vs. Maligno (Figura 7). Os valores de FDR foram selecionados entre os grupos para seleção dos genes de interesse (FDR <0.05). Com a comparação entre grupos é possível fazer seleção de genes exclusivos e comuns nas análises, além de um enriquecimento gênico feito com o pacote EnrichR.

Foram identificados 2.207 transcritos DE (ANOVA com $p \leq 0.05$), sendo 1.377 codificadores, 1.082 não codificadores e 360 sem identificação chamados de “*unassigned*” (este último foi excluído das análises subsequentes). Para a comparação entre os grupos (Figura 5) foram considerados \log_2 FC (\log_2 -fold-change) ≤ -2 como expressão diminuída e ≥ 2 como expressão aumentada e $p \leq 0.05$, para ambas as condições. A comparação entre o perfil dos tumores malignos vs. tecido normal e tecido

benigno foi realizada para identificar as particularidades de expressão de cada grupo. Aplicando os filtros estatísticos acima, foram identificados, para comparação entre o grupo Benigno vs Normal, 54 genes com expressão aumentada (34 codificadores, 11 não codificadores e 9 unassigned) e 310 genes com expressão diminuída (154 codificadores e 61 não codificadores). Nestas comparações não houve genes expressos com $FDR \leq 0.05$.

Para a comparação entre os grupos Normal vs. Maligno, foram identificados 232 genes codificadores e 51 não codificadores com expressão aumentada e 625 genes com expressão diminuída (492 codificadores e 133 não codificadores). Apenas dois genes apresentaram expressão aumentada e 21 expressões diminuídas considerando o $FDR \leq 0.05$. Na comparação entre os genes dos grupos Benigno vs. Maligno, foram identificados 287 genes com expressão aumentada (229 codificadores e 58 não codificadores) e 394 com expressão diminuída (309 codificadores e 85 não codificadores). Deste total, 11 genes com expressão aumentada e 46 com expressão diminuída apresentaram $FDR \leq 0.05$.

Comparação	Grupo 1	Grupo 2	n - Grupo 1	n - Grupo 2	Genes aumentados	Genes diminuídos	Total
Benigno vs. Normal	Benigno	Normal	7	3	54	310	364
Maligno vs. Normal	Maligno	Normal	7	3	320	814	1134
Benigno vs. Maligno	Benigno	Maligno	7	7	332	497	829

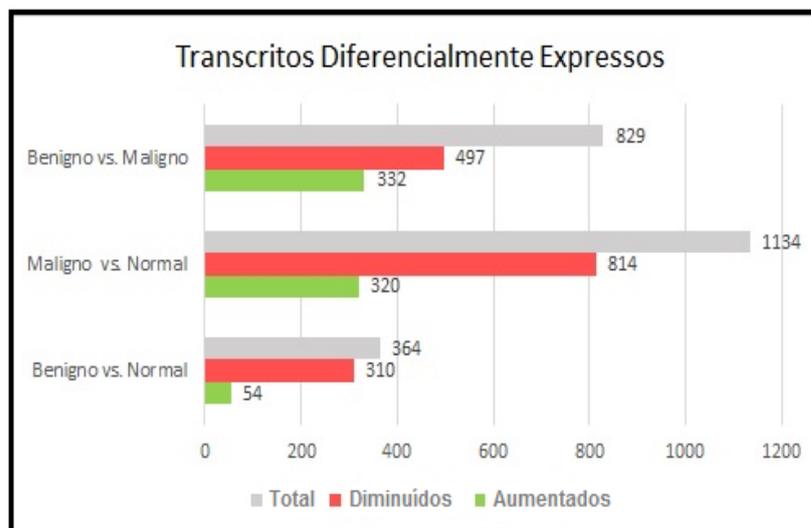


Figura 7 - Descrição da distribuição dos transcritos diferencialmente expressos entre os grupos comparativos e a predominância dos genes aumentados e diminuídos nas 17 amostras analisadas.

Para visualização da distribuição do número de transcritos presentes nos grupos e entre eles, foi construído um Diagrama de Venn (Figura 8) usando software Venny 2.1 (<https://bit.ly/2NillxB>)

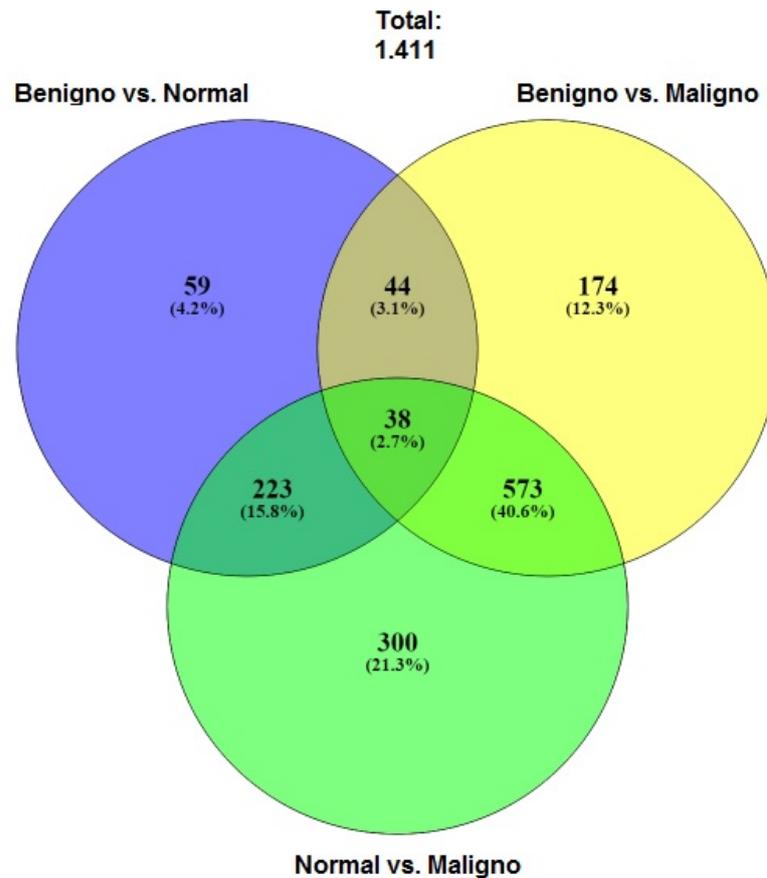


Figura 8 - Diagrama de Venn representativo da comparação e distribuição do número de transcritos diferencialmente expressos em comum nos diferentes grupos (Venny 2.1 - <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

A análise de agrupamento das 17 amostras usando as sondas com maior variação entre os casos permitiu a detecção de três grupos distintos (Figura 9) apresentados nos *heatmaps* nas comparações entre os grupos (ANOVA) e entre os pares Maligno vs. Benigno, Maligno vs. Normal e Benigno vs Normal quando $p < 0.05$ e $FC > 2$ e < -2 .

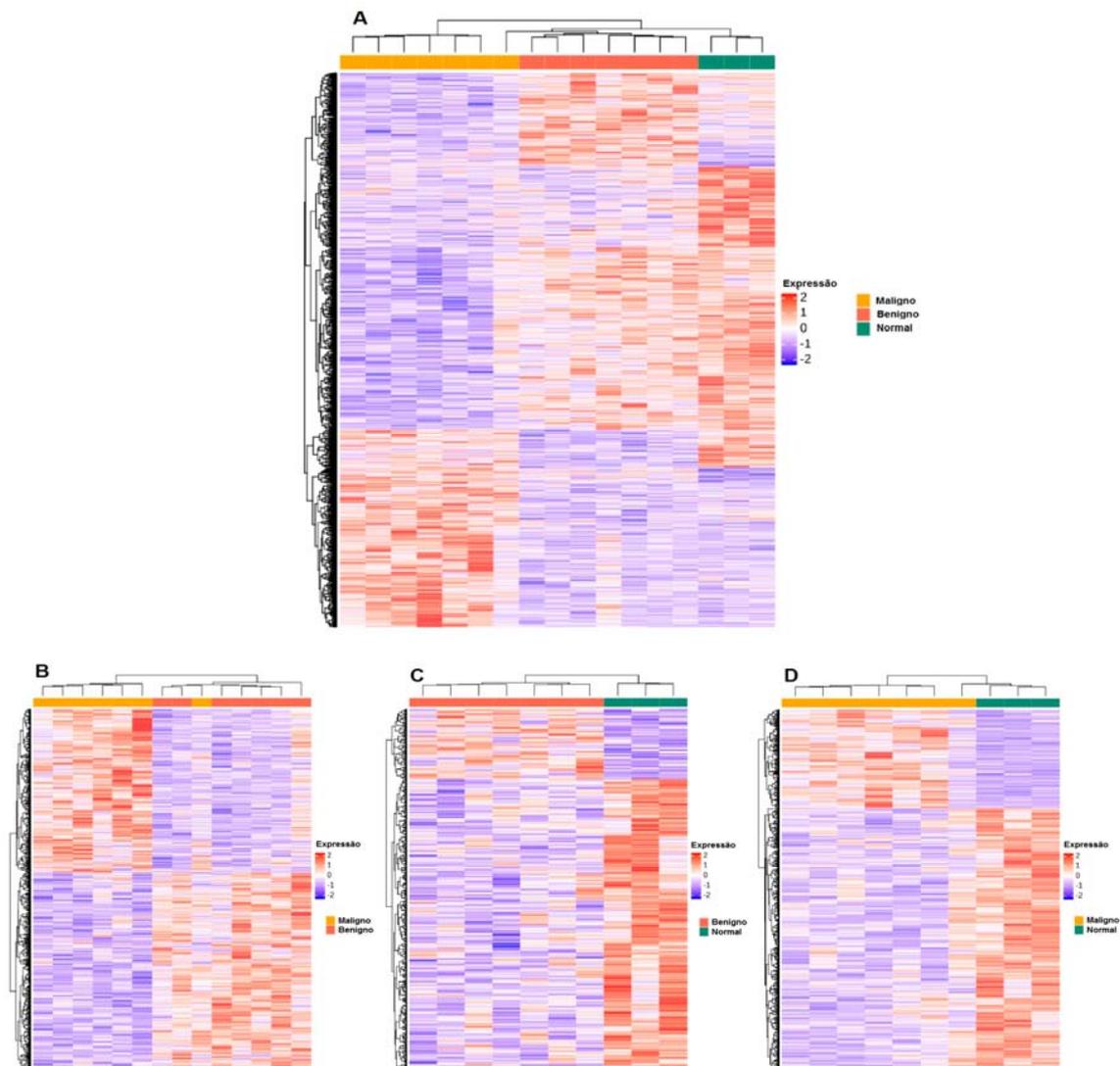
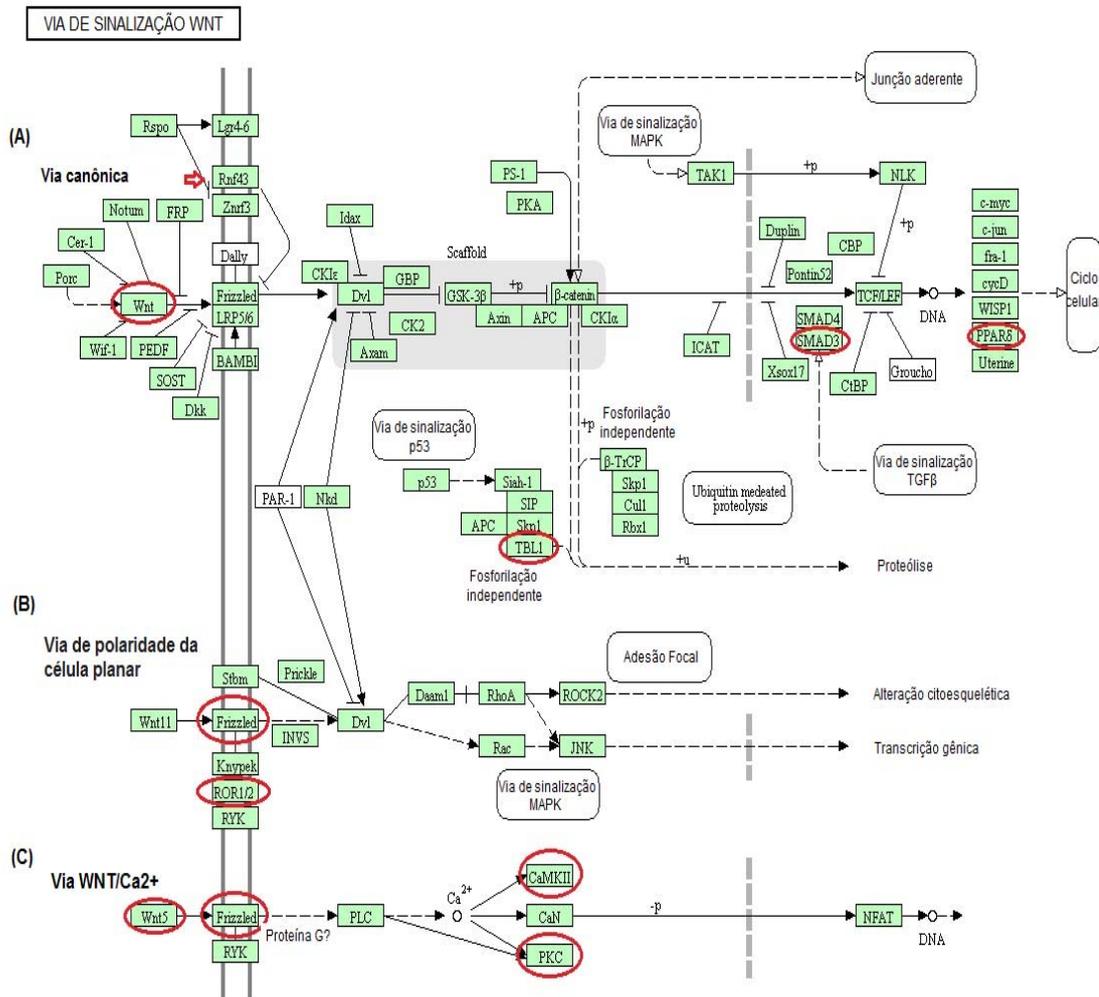


Figura 9 - Heatmaps demonstrativos do perfil de expressão dos transcritos diferencialmente expressos nas diferentes comparações entre grupos. As linhas representam os transcritos e as colunas, as amostras. Os valores de expressão estão representados por cores, onde vermelho e azul representam maior e menor expressão respectivamente. Os valores correspondem a expressão dos transcritos, em \log_2 , e são variados dependendo da sua matriz de expressão. **A:** expressão comparativa entre amostras normais, benignas e malignas. **B:** comparação da expressão entre os grupos Maligno vs. Benigno mostrando 1 amostra tumoral entre as amostras benignos. **C:** comparação entre os grupos de amostras benignas vs. normais. **D:** comparação entre os grupos de tumores malignos vs. normais.

Na matriz completa do banco de dados diversos genes foram filtrados e removidos da análise pois não atendiam aos critérios estatísticos, incluindo os genes alvo do estudo *WNT5A* e *WNT7A*. O dataset TCGA não apresenta amostras normais de ovário o que não permite uma validação criteriosa dos dados. No entanto outros genes diferencialmente expressos e pertencentes à via de sinalização WNT foram encontrados alterados como; *RORA* (não codificador), e os genes codificadores *WNT2B*, *RNF213*, *FZD6*, *TBL1XR1*, *PRKCI*, *PRKACA*, *SMAD3*, *PPAR* e *CAMK2*.

A Figura 10 ilustra os genes relacionados à via WNT (circulados em vermelho) que foram detectados como alterados em nosso estudo (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG; <https://bit.ly/2GVe8ry>). Os genes encontrados pertencem às possíveis vias de ativação; via canônica β -catenina dependente e a via não canônica, sendo esta última subdividida entre a via Cálcio dependente e a via de polaridade da célula planar.



Fonte: Adaptado de KEGG (2019)

Figura 10 - Genes envolvidos nas três vias mais conhecidas de ativação de WNT. Em vermelho, os genes diferencialmente expressos nas comparações.

(A): A via canônica, que controla a regulação da expressão gênica por induzir a ativação mediada por β-catenina, e se acumula no citoplasma translocando-se para o núcleo em caso do receptor presente. Na ausência de sinal, ocorre a degradação da β-catenina, ubiquitinada e degradada por proteassoma, pela fosforilação (+p) do complexo de destruição formado por Axina, APC e GSK3. A via não canônica se divide em duas vias; **(B):** Na via de polaridade da célula planar, onde FZD funciona através das proteínas G para ativar a DVL, que então sinaliza para as GTPases Rho ou Rac, que se ativa induzindo mudanças no citoesqueleto. **(C):** Na via de cálcio, onde o cálcio intracelular é liberado pela ativação de DVL que ativa a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII).

A força da associação entre os genes é medida por valor =1 quando positiva e =-1 quando negativa (Figura 11). Quando a correlação apresentou valor próximo ou igual a 1 demonstrou uma forte associação positiva, o que significa uma correlação diretamente proporcional entre os genes. O valor próximo ou igual a =-1 demonstrou uma forte associação, porém negativa, significando uma correlação inversamente proporcional entre os genes.

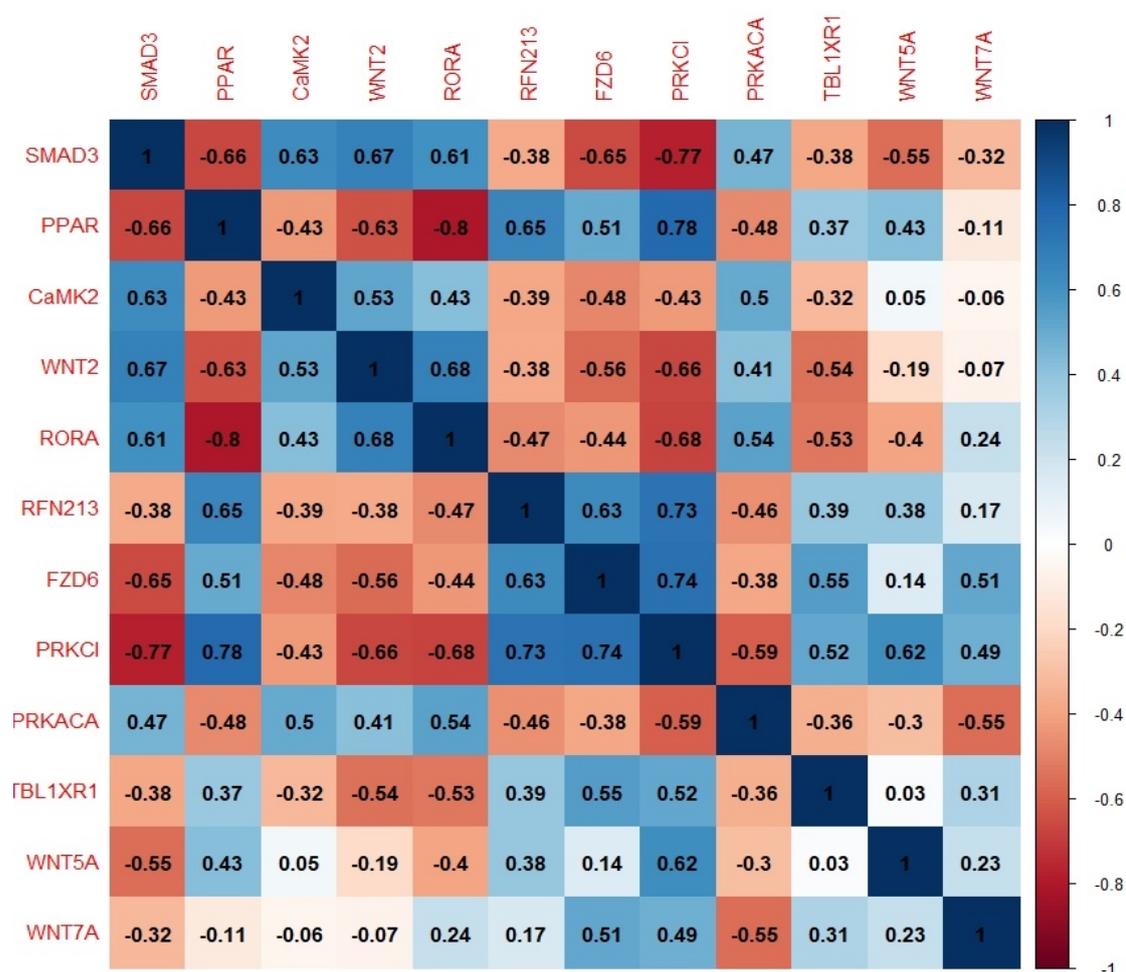


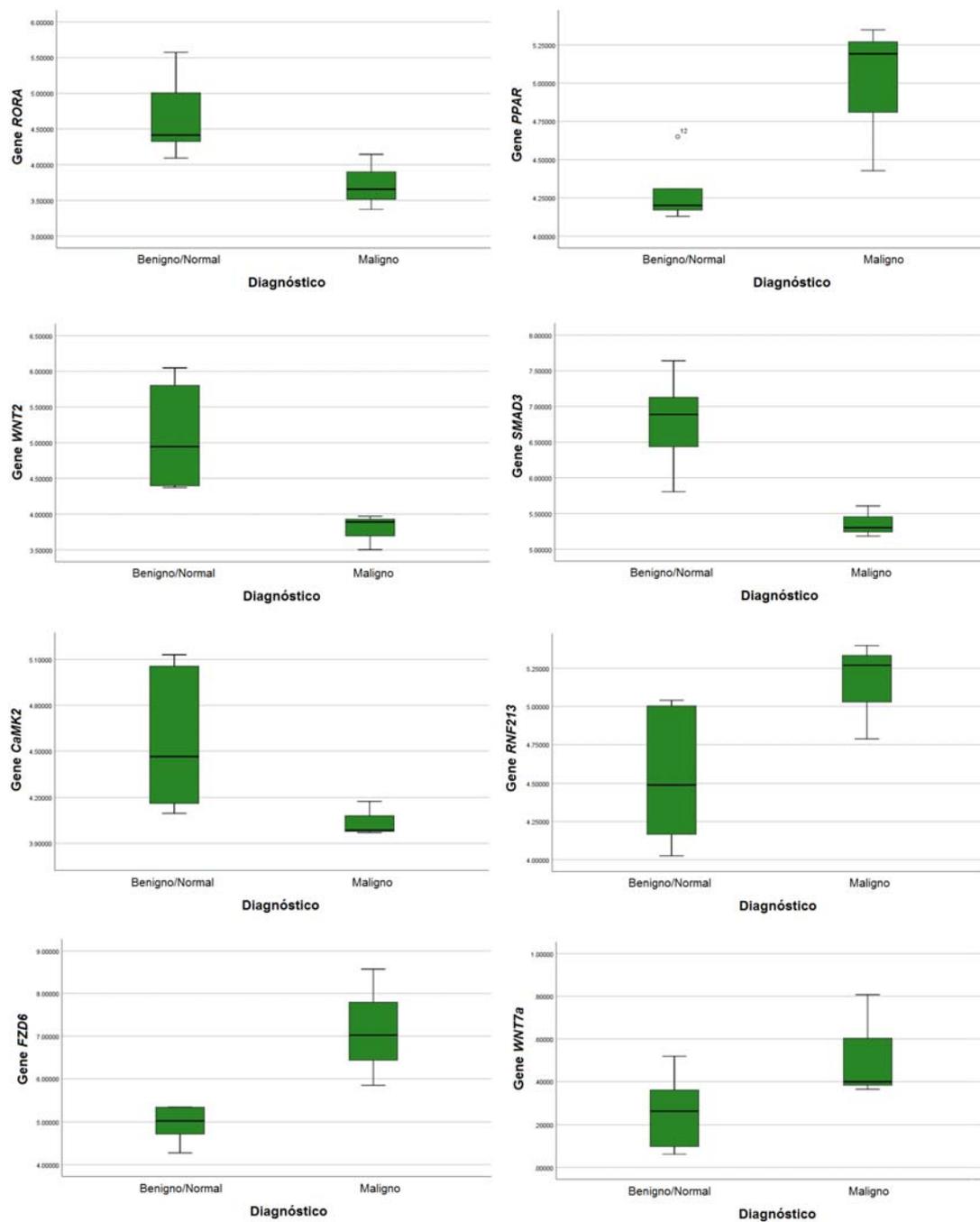
Figura 11 - Grau de associação entre os genes WNT5a e WNT7a com os genes transcritos encontrados como diferencialmente expressos e dos outros genes entre si. Forte associação positiva =1 e forte associação negativa quando =-1.

Na Tabela 18 está representada a significância dos transcritos diferencialmente expressos. Quando agrupados os casos normais e tumores benignos versus os tumores malignos observou-se que todos os genes apresentaram diferença estatística significativa em relação à progressão neoplásica, com exceção de *WNT5A* ($p=0,445$) e *WNT7A* ($p=0,214$)

Tabela 18 - Genes diferencialmente expressos da via WNT em relação a distribuição das amostras normais, benignas e malignas. Estão apresentados os valores de n, valor mínimo e máximo, média, mediana, desvio padrão e valor de p.

Gene		N	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio padrão	p
SMAD3	Total	17	5,19	6,23	5,81	7,64	0,75	0,002
	Maligno	8	5,19	5,68	5,61	6,58	0,42	
	Benigno/Normal	9	5,74	6,72	6,81	7,64	0,63	
PPAR	Total	17	3,92	4,53	4,33	5,56	0,46	0,004
	Maligno	8	4,29	4,82	4,69	5,56	0,49	
	Benigno/Normal	9	3,92	4,27	4,21	4,65	0,23	
CaMK2	Total	17	3,83	4,38	4,33	5,13	0,42	0,015
	Maligno	8	3,83	4,14	4,05	4,78	0,31	
	Benigno/Normal	9	4,10	4,60	4,56	5,13	0,39	
WNT2	Total	17	3,50	4,65	4,40	6,21	0,84	0,001
	Maligno	8	3,50	4,06	4,02	5,09	0,50	
	Benigno/Normal	9	4,37	5,17	5,16	6,21	0,75	
RORA	Total	17	3,19	4,29	4,32	5,91	0,80	0,027
	Maligno	8	3,19	3,93	3,56	5,91	0,90	
	Benigno/Normal	9	3,73	4,61	4,45	5,57	0,57	
RNF213	Total	17	4,02	4,85	4,83	6,06	0,51	0,011
	Maligno	8	4,72	5,19	5,14	6,06	0,43	
	Benigno/Normal	9	4,02	4,55	4,61	5,04	0,37	
FZD6	Total	17	4,27	5,85	5,35	9,05	1,37	0,001
	Maligno	8	4,94	6,88	6,61	9,05	1,35	
	Benigno/Normal	9	4,27	4,93	4,87	5,35	0,40	
PRKCI	Total	17	5,26	6,30	5,83	8,13	0,94	0,000
	Maligno	8	5,83	7,05	6,91	8,13	0,81	
	Benigno/Normal	9	5,26	5,63	5,52	6,42	0,35	
PRKACA	Total	17	3,51	5,08	5,15	6,70	0,85	0,027
	Maligno	8	3,51	4,67	4,46	6,70	0,94	
	Benigno/Normal	9	4,34	5,44	5,29	6,14	0,58	
TBL1XR1	Total	17	5,68	8,07	8,09	11,26	1,23	0,046
	Maligno	8	7,18	8,75	8,61	11,26	1,28	
	Benigno/Normal	9	5,68	7,47	7,67	8,27	0,84	
WNT5a	Total	13	0,09	2,23	1,64	10,02	2,91	0,445
	Maligno	6	0,38	2,29	1,67	6,48	2,18	
	Benigno/Normal	7	0,09	2,17	0,47	10,02	3,60	
WNT7a	Total	12	0,06	0,88	0,38	5,17	1,43	0,214
	Maligno	4	0,37	0,85	0,60	1,82	0,68	
	Benigno/Normal	8	0,06	0,90	0,35	5,17	1,74	

A Figura 12 representa as cinco estatísticas pelos box splots criados, onde os dados mínimos e máximos mostram a variabilidade de cada gene entre cada grupo.



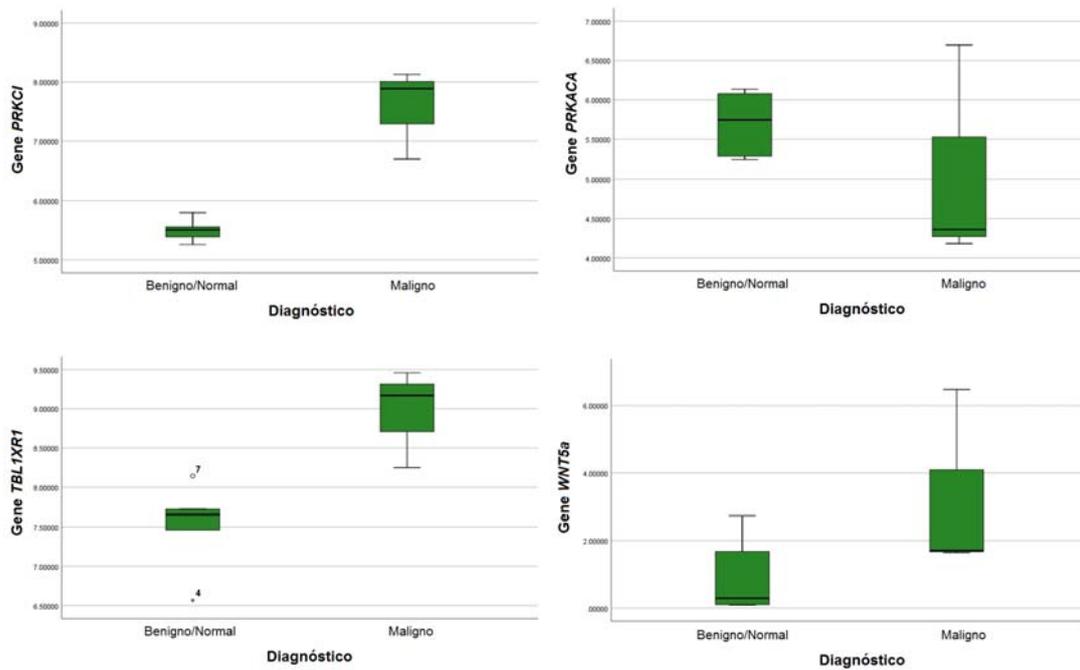


Figura 12 - Os box plots representam a distribuição dos níveis de expressão dos 12 transcritos *SMAD3*, *PPAR*, *CAMK2*, *WNT2*, *RORA*, *RNF213*, *FZD6*, *PRKCI*, *PRKACA*, *TBL1XR1*, *WNT5a* e *WNT7a* nos grupos normais+benignos comparados aos carcinomas de ovário.

6 DISCUSSÃO

6.1 EPIDEMIOLOGIA ASSOCIADA AO DIAGNÓSTICO E ÀS ALTERAÇÕES GÊNICAS E PROTEICAS

Alguns estudos, como de BEREK et al. (2010) mostram que alguns fatores de riscos e condições, como a menopausa, podem aumentar a chance de câncer de ovário. Este mesmo autor mostrou que a incidência de malignidade foi de 30% em mulheres na pós-menopausa contra apenas 7% dos tumores epiteliais de ovário em mulheres ainda menopausadas.

Diversos autores na literatura também relatam o uso de contraceptivos orais e aumento do número de filhos como fatores de proteção, provavelmente devido à inibição da ovulação, mostrando uma relação inversa entre a paridade e o uso de ACO, sendo a contracepção um dos principais fatores favoráveis contra mortalidade por câncer de ovário nos países desenvolvidos (LA VECCHIA. 2017; KIM. et al. 2018). Segundo PEARCE et al. (2009), o risco de vida na população geral pode variar de 0,35% (IC95% = 0,29% a 0,42%) a 8,8% (IC95% = 7,1% a 10,9%) dependendo da exposição para seis fatores: uso de ACO, paridade e número de filhos, laqueadura, endometriose, escore de risco genético e histórico familiar de câncer de ovário de primeiro grau. No entanto, em uma primeira análise comparativa nos grupos individualizados mencionados anteriormente, não houve significância estatística das pacientes que

relataram fazer uso de anticoncepcional oral ou terem parido um ou mais filhos, embora o número das pacientes que tenham relatado fazer uso de ACO ter sido quase a metade dos casos (47,2%) e a maior parte terem gestado anteriormente (59,8%). Estes achados podem ter relação com o fato da maioria das pacientes que relataram não usar ACO terem idade acima de 40 anos (n=31) e já não mais fazerem uso contínuo da contracepção, seguindo o mesmo princípio para o número de filhos onde a maioria das pacientes com 2 ou mais filhos já estarem em idade acima dos 50 anos (n=22) se aproximando da idade descrita como risco para câncer de ovário (> 60anos). KIM et al. (2018) estratificando o resultado pela duração do uso de ACO, relatou que o uso de 1 a 5 anos exibiu efeito protetor diferencial entre os genótipos podendo trazer benefícios às pacientes, porém após a correção de múltiplos testes também não encontrou interação considerada estatisticamente significativa.

Segundo LA VECCHIA (2017), existe uma forte associação com histórico familiar de câncer de ovário, e mesmo algumas outras neoplasias selecionadas como o colorretal e o endométrio, com o surgimento de um câncer de ovário. Outro estudo multicêntrico caso-controle de câncer de ovário epitelial em pacientes afro-americanas (PARK. et al. 2018) foi realizado para estimar a associação entre história de endometriose, doença inflamatória pélvica, mioma e cisto ovariano com câncer de ovário epitelial e relatou uma associação entre histórico de endometriose com câncer de ovário (OR 1,78; IC 95% 1,09-2,90). Os resultados de histórico de câncer previamente à realização deste projeto revelou que 16 pacientes foram

diagnosticadas no passado com algum outro tipo de câncer anterior, sendo 10 pacientes com tumores de mama representando a maioria (62,5%) dos casos. Das 10 pacientes com câncer de mama anterior ao projeto, 5 delas relataram fazer uso de ACO, porém nenhuma delas estavam no grupo dos casos malignos para ovário, as outras 5 pacientes não responderam ao prontuário. Com relação à um tumor mamário anteriormente, este dado, embora com n pequeno, corrobora a teoria que sugere que contraceptivos conferem pequeno aumento no risco de câncer de mama, doença hormônio dependente, mas um efeito protetor sobre tumores epiteliais de ovário, embora o Pvalor não tenha sido significativo estatisticamente mostrando o ACO como fator protetor e um histórico familiar de câncer de mama que possa ter origem na mutação herdada dos genes BRCA1 ou BRCA2, também poder causar câncer de ovário. Contudo, como mostrando anteriormente (Tabela 14), houve diferença significativa estatisticamente nas pacientes que apresentaram tumores prévios ($p=0,049$), principalmente tumores de mama, podendo afirmar que ter um diagnóstico anterior de câncer pode elevar as chances de desenvolver câncer de ovário.

Segundo a ACS (2019), a idade aumenta o risco de desenvolver câncer de ovário, que geralmente se desenvolve após a menopausa, onde metade dos casos é diagnosticado em mulheres acima de 63 anos e raramente diagnosticado em mulheres com menos de 40 anos. Na análise estatística não encontramos diferença significativa da idade pois das 19 mulheres acima de 60 apenas 7 eram diagnosticadas com tumor maligno, e diminuindo a idade das 40 mulheres acima de 50 anos apenas 13 eram

diagnosticadas com tumor maligno. Segundo INCA, cerca de metade (50%) das pacientes diagnosticadas com câncer possuem idade superior a 63 anos, no entanto com idade próxima a este dado das 22 pacientes com tumor maligno no estudo, haviam 2 pacientes com 60 anos, 1 com 61 anos e 3 com 62 anos, e apenas 1 havia mais de 63 anos que representa 4,54% dos casos (Ministério da Saúde 2018b).

Também não foram encontradas associações entre o tabagismo e o etilismo no presente estudo em relação ao diagnóstico, corroborando a literatura (LA VECCHIA 2017) que mostra não haver associações fortes com álcool e tabaco de forma geral, embora tenha sido relatada uma ligação direta com o tabaco e cânceres mucinosos (limítrofes). Porém associação esta de significância limitada no que diz respeito a mortalidade geral por câncer de ovário.

Nos Estados Unidos, o risco médio vitalício de diagnóstico de câncer de ovário para mulheres é de 1,3% que depende do histórico de exposição aos fatores de risco e fatores de proteção (KIM et al. 2017). A baixa significância dos fatores epidemiológicos talvez seja pelo fato dos fatores de risco descritos na literatura serem relacionados apenas a uma proporção limitada de casos de câncer de ovário a nível populacional. Um viés de análise de dados epidemiológicos pode ser a questão ainda não resolvida da falta de padronização nos preenchimentos de prontuários. De todos os casos, 37,1% não possuíam informação sobre etilismo, 24,7% sobre tabagismo, 7,9% sobre paridade e multiparidade e 19,1% sobre uso de anticoncepcionais.

Os fatores epidemiológicos e sociais foram também cruzados com a expressão gênica e proteica de WNT5a e WNT7a; o critério dos tumores previamente diagnosticados não apresentou diferença estatística quando relacionados às expressões, diferentemente do apresentado quando relacionado com os quadros clínicos mencionados acima. Assim como na associação aos quadros clínicos, também não houve diferença estatisticamente significativa entre o tabagismo e o etilismo com expressão tanto gênica quanto proteica. No entanto, há indícios que alguns fatores epidemiológicos possam estar associados diretamente com a expressão de genes e proteínas, como no estudo de HEIJINK et al. (2016), foi analisada a expressão da proteína WNT5b no tecido pulmonar de pacientes com DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) e os efeitos da exposição à fumaça de cigarro em WNT5b em PBECs (células epiteliais brônquicas primárias derivadas de controle). O estudo também avaliou os genes fibronectina, metaloproteinase de matriz (MMP-2 e MMP-9) e Snail em PBEC cultivadas, que fazem parte desta remodelação. Os autores relataram que a expressão de WNT5b foi maior significativamente no tecido pulmonar de pacientes com DPOC do que nos controles e que o extrato de fumaça de cigarro aumentou significativamente a expressão de mRNA do WNT5b na DPOC. E que a mediação pela sinalização do fator de crescimento transformador (TGF)- β /SMAD3 aumentou a expressão de genes relacionados à remodelação pela adição exógena de WNT5b, mostrando evidências de que a expressão exagerada de WNT5b na exposição à fumaça de cigarro no epitélio de

pacientes com DPOC leva à expressão dependente de genes como TGF- β /SMAD3 relacionados ao remodelamento das vias aéreas.

O critério de multiparidade e aumento do número de filhos, que embora não tenha apresentado significância quando comparado aos quadros clínicos, na associação com o gene e a proteína WNT7a, não mostrou resultado significativo porém apresentou diferença estatisticamente significativa quando relacionado diretamente com expressão do gene *WNT5a* ($p=0,005$) e da proteína WNT5a ($p=0,044$). Nos dados, 88,9% das amostras com genes aumentados eram de pacientes de 0 a 1 filho vs. 11,1% com 2 filhos, que 55,5% das amostras com gene diminuído eram de mulheres de 0 a 1 filho vs. 31% com 2 filhos, e que 58,7% das amostras com genes expressos normalmente eram de pacientes com 2 filhos ou mais. A associação da multiparidade com a expressão da proteína WNT5a se mostrou significativa pois os dados mostram que de todas as lâminas com marcação proteica ausente, 50% não tinham filhos e 50% tinham 3 filhos, que as lâminas com marcação leve se distribuiu até 4 filhos de forma decrescente, e que 100% das lâminas com marcação intensa foram em amostras de pacientes com no máximo 2 filhos. Esse dado mostra que o aumento do número de filhos pode ser um fator protetor contra a desregulação gênica e proteica. Alguns estudos, como de MEIER et al. (2013) e MEIER e BENTIREs (2014), mostraram que a paridade, e também gestações precoces, podem estar associadas a regulação da expressão de genes da via WNT e a um forte efeito protetor contra o câncer de mama. Estes estudos recentes foram realizados em subpopulações de células

epiteliais isoladas de glândulas mamárias de camundongos e humanos e mostraram que a gravidez precoce diminui a proporção de células positivas para receptores hormonais provocando mudanças na expressão gênica e possivelmente um mecanismo que diminua a sinalização de WNT em células tronco/progenitoras basais. Um dos estudos encontrou uma redução de mais de três vezes na expressão do ligante secretado *WNT4* em células mamárias levando a uma diminuição na proporção de *WNT4* secretor e receptores de estrogênio/progesterona. Segundo os autores, essa ação resgatou o defeito de proliferação de células basais in vitro e concluíram que a redução da secreção de *WNT4* parece estar relacionada à paridade e alterações das propriedades da célula basal/progenitoras. Foi observado também uma diminuição da proliferação em células troncos, que incluem transformação da sinalização do *TGF-β* e também regulação negativa de *WNT* como prevenção do câncer de mama.

A diferença significativa também foi encontrada entre o uso de anticoncepcional vs. expressão do gene *WNT5a* ($p=0,011$) e da idade vs. expressão do gene *WNT5a* ($p=0,012$). Dos genes diminuídos que possuíam informação de contracepção oral, 61,5% tinham histórico do uso anticoncepcionais e 100% das amostras com genes aumentados não relataram uso de anticoncepcional em nenhum momento da vida. É sabido que os anticoncepcionais promovem a manutenção constante dos hormônios estrógeno e progesterona, tanto no ciclo menstrual, como na gestação, que por sua vez superam os hormônios desencadeantes da ovulação e se mantêm constantes, mantendo os óvulos em “stand by” o que

impede a ovulação. Essa ação é realizada mecanismo chamado de “feedback”, capaz de inibir a secreção hipofisária de FSH e LH. Há décadas, como é possível observar no estudo de GWINN et al. (1990), os efeitos da amamentação, de cumulativos meses de gravidez e do uso de anticoncepcionais vem sendo associados com o risco de desenvolver câncer de ovário epitelial. Neste estudo multicêntrico, caso controle, os autores usaram dados de 436 mulheres com idade entre 20-54 anos com câncer de ovário epitelial recém-diagnosticado e de 3833 mulheres com idade entre 20-54 anos, e puderam avaliar que a estimativa dos riscos relativos de câncer de ovário epitelial foram 0,6 (IC 95% 0,5-0,8) para mulheres que já haviam engravidado, 0,6 (IC 95% 0,5-0,8) para mulheres que já haviam amamentado e 0,5 (95 IC% 0,5-0,7) para mulheres que já haviam usado contraceptivos orais, o que mostrou forte tendência na diminuição do risco de câncer de ovário epitelial com o aumento dos meses acumulados de gravidez e o fato de amamentarem e usarem ACO reduziu fortemente o risco de câncer. Segundo YU et al. (2015), ainda não está completamente elucidado a forma com que o endométrio se desenvolve nem quais vias de sinalização estão totalmente presentes neste processo e relata como o útero se desenvolve nos ductos mullerianos onde as células, com expressão de WNT7a, dão origem a células epiteliais do útero e trompas de falópio, e as células com expressão de WNT5a dão origem a células estromais.

Atualmente, 20 tipos de proteínas WNT secretadas já foram estabelecidas que podem combinar-se com o receptores da família Frizzled na superfície celular, podendo ativar as três vias diferentes de sinalização já

mencionadas anteriormente. Alguns desses membros da via WNT, como alguns ligantes, componentes da sinalização, inibidores e receptores são expressos no endométrio, como é o caso de um potente inibidor da via, chamado de Dkk-1 (Dickkopf-1), descoberto recentemente sendo regulado positivamente na decisão das células estromais endometriais durante a fase secretora da menstruação, sugerindo a regulação pela progesterona, uma justificativa plausível do motivo dos ACOs agirem como fator protetivo contra câncer de ovário, devido à associação na fisiologia do aparelho reprodutor como ovulação, mesmo os cânceres de origem nas células germinativas ou de células estromais (OEHLER et al. 2002; WEN-ZHU et al. 2015; TULAC et al. 2016).

Para que mais dados epidemiológicos possam ser avaliados como fatores de risco ou fatores de proteção, é necessário que se mude o hábito cultural do preenchimento dos prontuários médicos de forma metódica, não apenas para que se conheça mais o histórico do paciente, mas também para que se possa conhecer melhor a doença, pois um “dado” registrado é matéria prima geradora de informação.

6.2 ASSOCIAÇÃO DO RISCO DE CÂNCER DE OVÁRIO NCOM EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA

A associação entre as variáveis qualitativas e sua correlação com os marcadores, genes e proteínas, foi realizada pelo teste *qui*-quadrado ou o teste exato de Fisher considerando uma significância de $p < 0,05$. A princípio,

segundo o objetivo do projeto, era esperado que os todos os casos normais apresentassem expressão gênica diminuída ou normal e uma marcação ausente ou leve da proteína, que os casos benignos apresentassem expressão gênica normal e proteína também expressada de forma normal, e que os casos malignos apresentassem expressão gênica aumentada e expressão proteica intensa, confirmando a hipótese levantada. No teste de associação o gene *WNT5a* não apresentou diferença estatística significativa quando comparados os grupos individualizados, nem quando comparado a junção dos grupos normais e benignos vs. malignos. No entanto, do n amostral dos casos normais e benignos a maior predominância se manteve nos casos com expressão diminuída enquanto a distribuição dos casos malignos se manteve em maior equilíbrio entre as expressões diminuídas à aumentadas (Tabela 3).

Embora sem valor de p significativo, a regressão logística mostrou forte associação entre os grupos, mostrando que já junção dos casos normais e benignos há uma 44% menos de chance dos casos que possuem expressão diminuída de desenvolver malignidade comparada a expressão aumentada e 18% menos de chance dos casos de expressão normal de desenvolvimento tumoral maligno comparada a expressão aumentada do gene *WNT5a*. Na associação da expressão gênica de *WNT7a* com os quadros clínicos, igualmente para *WNT5a*, não houve diferença significativa entre a expressão dos genes vs. os casos normais, benignos e malignos. Para o agrupamento entre os casos normais e benignos, o *odds* não se obteve valores estatísticos devido aos valores ausentes em algumas

comparações, que pode ter origem no n amostral pois não haviam casos na categoria de expressão aumentada.

Nossos dados foram homogêneos com alguns resultados de BADIGLIAN FILHO et al. (2009), comparando os alguns critérios epidemiológicos com os casos clínicos, como tabagismo $p=0,443$ vs. $p=0,443$, idade $p=0,145$ vs $p=0,472$. Já no estudo de BADIGLIAN FILHO et al. (2009) a idade foi significativa em relação ao diagnóstico ($p=0,061$) e neste estudo atual a idade foi significativa quando associada ao gene *WNT5a* ($p=0,012$).

A regressão logística da proteína WNT5a com os casos clínicos individualizados apresentou um valor próximo da significância para ($p=0,084$) com a maior parte das marcações inespecíficas ou ausentes tenham sido nos casos normais e as marcações leves em diante nos casos malignos. Não apresentou diferença significativa na associação entre a proteína e a junção dos casos normais com benignos ($p=0,999$) e embora no *odds ratio* a chance do grupo normal/benigno com marcação inespecífica e ausente de desenvolver tumor seja 72% menor do que as amostras com marcação leve, moderada ou intensa com valor significativo de $p=0,07$, as amostras consideradas como marcação negativa que incluem as marcações leves não apresentaram diferença estatística ($p=0,5$) em relação às marcações positivas. Para a proteína WNT7a também não houve diferença significativa quando comparada aos grupos individualizados ($p=0,252$) pois tanto as marcações inespecíficas e ausentes como as moderadas e intensas se mantiveram em equilíbrio entre os grupos. Quando agrupados os casos

normais e benignos a significância se manteve ausente com valor $p=0,999$ com *odds ratio* mostrando chance 7,7% menor da marcação negativa em contribuir para tumores malignos do que as marcações moderadas ou intensas, consideradas positivas.

Pensando na hipótese dos genes estarem diretamente relacionados entre si, foi testado a concordância de Kappa entre os genes (-0,032) o que não mostrou diferença significativa ($p=0,772$) entre os grupos, mostrando não haver concordância entre ambas expressões. Entre a associação das proteínas WNT5a e WNT7a houve concordância fraca (0,178) relevando uma diferença significativa ($p=0,020$) entre si. SHOUKRI (2004) em seu livro sobre medidas e Confiabilidade relata também que alguns testes apesar de terem alta sensibilidade e especificidade podem apresentar baixa capacidade preditiva e que é possível existe uma alta concordância entre dois avaliadores, mas com um baixo valor de Kappa. A fim de validar a técnica citológica, se realizou a técnica de imun-histoquímica também em tecidos, já estabelecida na literatura pela busca de biomarcadores, no entanto houve uma fraca concordância entre as técnicas ($p=0,346$) que pode ser resultado dos testes primários em citologia e do baixo número amostral para tal correlação. A maior parte dos casos com expressão diminuída do gene *WNT5a* também terem apresentado expressão diminuída do gene *WNT7a*, a falta de significância do dado pode ser resultado de não haver amostras nos grupos com expressão aumentada vs. expressão diminuída ou ainda por participarem de tipos distintos da via, *WNT7a* pela via canônica e

WNT5a pela via Ca^{2+} não canônica, e segundo FENGLI et al. (2008), uma das funções da via não-canônica é também inibir a sinalização canônica.

Em teoria, seria ideal dentro de uma pesquisa termos a capacidade de controlar as variáveis e fatores que não fazem parte do objetivo do estudo, onde o fenômeno estudado seria de fato a única variação de resultado dando forças para a verdade da hipótese. O que acontece na prática é que se torna impossível ter controle sobre variáveis diversas como fatores genéticos, hábitos sociais, epidemiologia e fatores geográficos, e para essa correção usa-se estatística, muitas vezes pareando os grupos. MOORE et al. (2014) em um estudo sobre medicamentos, mostraram que não havia diferença estatística significativa de tratamentos entre eles, porém do ponto de vista clínico seria altamente significativa a morte de um paciente em um dos tratamentos. Todo Pvalor está associado a uma hipótese e no caso da razão de chance entre os grupos (*odds ratio*), o valor $OR=1$ da hipótese significa que o evento tem chances iguais entre as categorias. Quando o valor de p é baixo indica evidências contra essa hipótese, e quando o valor alto indica pouca evidência contra essa hipótese. Segundo RUMSEY (2009), ao encontrar uma diferença estatística significativa tomamos como verdade que o resultado é devido aos efeitos maiores investigados e não à erros, fatores não controlados ou a obra do acaso. Portanto é necessário a cautela na interpretação dos dados, na forma de usar o valor de $p < 0,05$ como único parâmetro para se avaliar um resultado, pois embora ele complemente a análise e a força de associação, a análise descritiva dos dados e tabelas também é essencial.

É sabido que o RNAm é traduzido em proteína e por isso se assume a verdade que exista algum tipo de correlação entre eles, porém há diversos mecanismos pós-transcricionais variados envolvidos neste processo, ainda não totalmente definidos, pela capacidade de avaliar a quantidade de proteínas do RNAm. Além disso, segundo GREENBAUM et al. (2003), é possível que haja tanto uma diferença substancial na sua meia vida *in vivo* como uma quantidade significativa de erros experimentais causando viés e limitações nos dados, portanto não é incomum surgir uma correlação inversa entre gene e síntese final da proteína nativa, podendo não haver correlação significativa, que, em si, já é uma conclusão informativa. Com o passar dos últimos anos foi notável o desenvolvimento de tecnologias para quantificar proteínas. Ainda segundo GREENBAUM et al. (2003), os valores de expressão de RNAm são úteis em um amplo espectro da saúde, como em diagnósticos, e que, porém, são certamente resultados mais correlativos do que causativos, onde a verdadeira força causadora com a célula seja a concentração de proteínas e suas interações celulares.

ANDERSON e SEILHAMER (1997) em um dos primeiros estudos com objetivo de obter uma estimativa do nível global de correlação entre o RNAm e os níveis de abundância de proteínas, analisou 19 proteínas no fígado humano e encontrou uma correlação um pouco positiva de 0,48, mostrando que dos 50 RNAs´m mais abundantes no fígado, 29 eram codificadores para proteínas secretadas, enquanto nenhuma das 50 proteínas mais abundantes pareceu ser produtos secretados, o que corroborou com os dados do estudo de KAWAMOTO et al. (1996) sobre a abundância de RNAs´m para proteínas

plasmáticas secretadas pelo fígado onde sugeriu que mensagens de maior abundância são fortemente enriquecidas em sequências secretadas. LICHTINGHAGEN et al. (2002) estudaram três genes *MMP-2*, *MMP-9* e *TIMP-1* em câncer de próstata humano, em uma análise limitada que não mostrou correlação entre genes e proteínas. Porém alguns estudos no mesmo ano como de CHEN et al. (2002) e ORNTOFT et al. (2002) mostraram uma correlação significativa em apenas um pequeno subconjunto das proteínas e uma correlação altamente significativa em carcinomas humanos, respectivamente. São diversos os estudos que buscam correlacionar RNAm com e dados de proteína, para que seja possível determinar a quantidade e abundância proteica, onde a maioria mostrou uma baixa ou limitada correlação. Quando não há correlação positiva, é possível que os dados sejam utilizados como variáveis independentes de informação, por exemplo, para prever interações de proteína, avaliadas através de outros métodos.

A expressão das proteínas foi avaliada por imuno-citoquímica e para evitar resultados falso-positivos e classificação como marcação “leve”, as lâminas citológicas que apresentaram marcação intensa granular ou de fundo (background) na imuno-citoquímica foram classificadas como marcação inespecífica. Algumas causas deste resultado podem ser a ligação do anticorpo aos componentes tecidulares ou a presença de enzimas endógenas, ou ainda no caso do background, a coenzima biotina endógena (LOPES 2016).

Alguns estudos como de KRAJEWSKA (1996) apresentam outra forma de analisar a marcação proteica, pela multiplicação do escore da percentagem de positividade celular com o escore de intensidade de marcação, definindo o resultado das marcações como positiva ou negativa.

São muitas as técnicas para se verificar a expressão da proteína e mesmo sua inativação, porém, a imuno-histoquímica e a imuno-citoquímica são mais frequentes. Pode existir um viés experimental dependendo do tipo do anticorpo, tempo de incubação, diferentes métodos de recuperação antigênica em lâminas histológicas, uma interpretação falta um de *cutoff* homogêneo em caso de positividade além muita subjetividade sobre a intensidade de marcações ou de escores, dependendo da análise utilizada. SHOUKRI (2004) em seu livro sobre medidas e Confiabilidade relata que alguns testes apesar de terem alta sensibilidade e especificidade podem apresentar baixa capacidade preditiva e que é possível existir uma alta concordância entre dois avaliadores, mas com um baixo valor de Kappa.

De forma geral, a expressão genica de *WNT5a* não foi significativa nos casos clínicos, porém houve diferença significativa da proteína *WNT5a* com algumas situações agrupadas. Quando associados os fatores epidemiológicos com os casos clínicos houve diferença significativa apenas com os tumores previamente diagnosticados, mas quando associados esses fatores diretamente aos genes e proteínas, o número aumentado de filhos, o uso de anticoncepcional e a idade foram associadas significativamente entre o gene *WNT5a*, e o número de filhos também associado à proteína *WNT5a*.

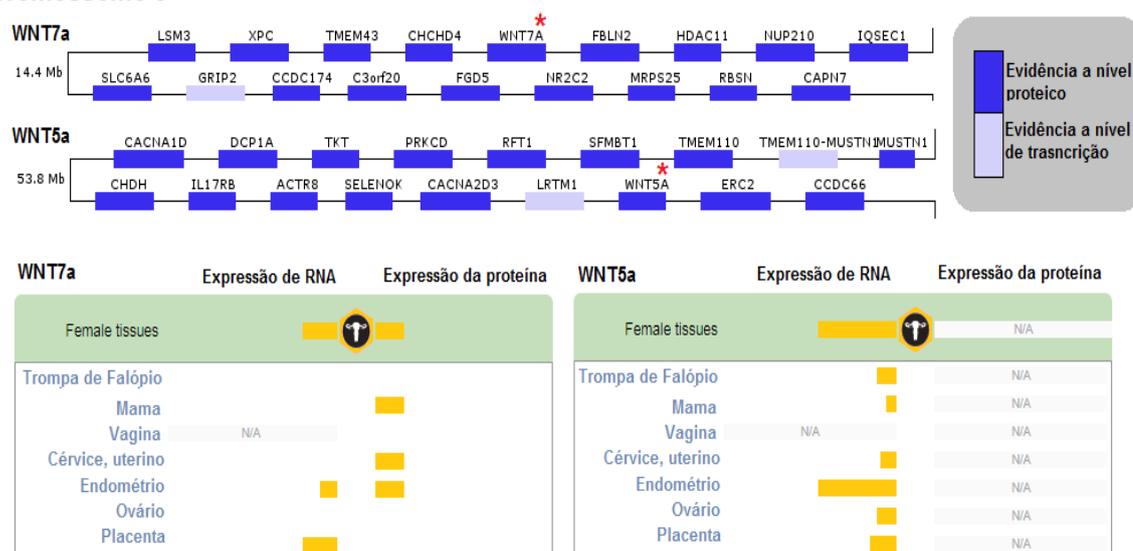
A expressão gênica de *WNT7a* também não apresentou significância quando associada aos casos. Já a proteína WNT7a não apresentou significância quando associada aos casos embora o *odds* tenha dado um valor significativo.

Os fatores epidemiológicos não se mostraram significativos entre o gene *WNT7a* nem a proteína WNT7a. Portanto, os casos clínicos foram mais associados ao fato de outros tumores prévios terem sido diagnosticados, a expressão do gene *WNT5a* se mostrou significativa em alguns fatores epidemiológicos e a expressão da proteína WNT5a se mostrou significativa em alguns casos clínicos agrupados e a fatores epidemiológicos isolados. O gene *WNT7a* não apresentou diferença significativa nem entre os casos clínicos nem com fatores epidemiológicos e a expressão da proteína WNT7a apresentou certa significância apenas em um dos agrupamentos clínicos. Não houve concordância entre os genes entre si, porém houve concordância significativa entre as proteínas entre si. Esperava-se que para ambas proteínas, a marcação leve estaria presente nas amostras normais para ovário e assim progressivamente até uma marcação intensa em casos malignos, o que não foi observado em todos os casos testados.

A expressão mais significativa das proteínas em relação à expressão dos genes sugere que outros mecanismos relacionados às proteínas envolvidas no ciclo celular possam estar alterados independente da integridade da via WNT. No entanto, é preciso cuidado ao avaliar a correlação da proteína pois podem estar presentes fatores limitante na detecção por imuno-citoquímica como a rápida degradação da proteína.

Esses resultados corroboram com a informação do The Human Protein Atlas-THPA ilustrado na Figura 13, que relatam uma maior evidência proteica de WNT5a e WNT7a do que gênica, onde a coloração do anticorpo de WNT7a não consiste com os dados de expressão de RNA, e, portanto, se tratando da confiabilidade da imuno-histoquímica pode haver diferença na correlação entre a proteína secretada e a localização do tecido do RNA e da proteína. Para WNT5a ainda há ausência de informação sobre os tecidos de maior confiabilidade em relação aos anticorpos disponíveis.

Cromossomo 3



Fonte: Adaptada The Human Protein Atlas (2019a e b).

Figura 13 - Representação dos níveis de evidência a nível proteico e transcrricional de *WNT5a* e *WNT7a* no cromossomo 3 e diversos tecidos do trato reprodutor feminino.

A maior concentração de proteínas em relação aos genes, bem como as razões aumentadas dos genes e proteínas em determinadas variáveis muitas vezes com p não significativo, provam o desequilíbrio proteolítico no câncer de ovário, que não parece estar associado necessariamente com a evolução crescente do grau do câncer. A comparação entre expressão de gene e proteína, respectivamente, não mostrou correlações significativas entre si, ilustrando a necessidade de estudar esses componentes por outros meios experimentais, a fim de corroborar nossos resultados.

6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GLOBAL DE TRANSCRITOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A VIA WNT

A nova tecnologia de microarrays tem capacidade de analisar o genoma e mapear as características da expressão gênica. O ensaio Clariom D, considerado a próxima geração de ferramentas de perfil de expressão fornece uma visão detalhada de todo o transcriptoma, para previsão e direcionamento da área molecular baseando-se em medicamentos e terapia molecular. Essa técnica possibilita as assinaturas de biomarcadores de alta fidelidade com rapidez e facilidade.

É possível identificar pelos Heatmaps que os genes diferencialmente expressos diferem nitidamente sua expressão entre os grupos malignos e os demais, normais e benignos. Em todos os heatmaps se pode observar que os genes aumentados no grupo dos malignos estão diminuídos nos grupos dos normais e benignos e vice-versa. Esse dado indica não apenas a relevância que os genes podem mostrar na progressão maligna e no suporte à carcinogênese, já que é esperado que em tumores malignos haja alteração molecular, mas também a confiabilidade da expressão dos genes analisados individualmente relacionados à via WNT.

Buscando validar nossos resultados e encontrar outros possíveis biomarcadores da via, analisamos o material genético das amostras microdissecadas de tecido parafinado e foram encontrados no total 18 DEGs WNTs codificadores (*WNT1*, *WNT2*, *WNT2b*, *WNT3*, *WNT3a*, *WNT4*, *WNT5a*, *WNT5b*, *WNT6*, *WNT7a*, *WNT7b*, *WNT8a*, *WNT8b*, *WNT9a*,

WNT9b, *WNT10a*, *WNT10b*, *WNT11* e *WNT16*) e 3 não codificadores (*WNT3*, *WNT5a*, *WNT5a-AntiSense*). Na análise do transcriptoma o foco na busca se limitou aos genes relacionados com a via WNT e sua função e os genes que foram encontrados diferencialmente expressos com dados significativos serão discutidos a seguir. Como citado anteriormente, o gene *WNT2b* se mostrou diferencialmente expresso com significância entre o grupo maligno comparado ao grupo benigno. Acredita-se que *WNT2b* seja capaz de desempenhar importante papel não só no desenvolvimento celular a níveis normais, bem como na carcinogênese, possuindo múltiplas variantes de transcrição, resultado de splicing alternativo. Não são muitos os estudos que correlacionam o *WNT2b* com o câncer de ovário, porém alguns, como de WANG et al. (2012) mostrou que a regulação negativa de *WNT2*, avaliada por técnicas de Western Blot e apoptose, inibiu formação e invasão de colônias celulares sugerindo que *WNT2b* possa desempenhar um importante papel em metástase do câncer de ovário e resistência a drogas.

Segundo alguns estudos como de MIKELS e NUSSE (2006) e YAMAMOTO et al. (2007), o receptor *ROR2*, uma tirosina quinase órfã também chamada de *RORA*, pode mediar o início da sinalização não-canônica de *WNT5a* sendo necessário para a inibição da sinalização canônica mediada por *WNT5a*, além de ser importante para a migração de células induzidas por *WNT5a*, o que pode envolver a estimulação intracelular. O *RORA* apresentou diferença próxima de significância entre os tumores malignos comparados ao grupo normal e diferença significativa entre os grupos malignos vs. normais e benignos. A estimulação celular pela

via não canônica de *WNT5a* pode ativar *FZD*, liberar Ca^{2+} e ativar *PKC* e *CaMKII*, que se mostraram diferencialmente expressos porém com valor de FRD ajustado não mostrando concordância com o Pvalor significativo, provável resultado da ausência de expressão significativa de *WNT5a*, precursor da via não canônica. O gene *CaMKII* foi relatado por HUANG et al. (2016) como potencial alvo terapêutico em cânceres de ovários quimioresistentes pois foi visto correlação entre a expressão de alguns genes e quimiorresistência induzida por cisplatina, pela avaliação de células SKOV3 tratadas com cisplatina onde a viabilidade, a proliferação e a citotoxicidade celular foram medidas por contagem de células colorimétricas sensíveis e os níveis de expressão detectados por Western Blot e imunofluorescência, onde concluíram que a via de sinalização WNT/ Ca^{2+} reduz a resistência à cisplatina, diferentemente da via canônica onde *β -catenina* e *JNK* promoveram resistência à cisplatina nas células ovarianas. O Pvalor ajustado por FDR é sempre a melhor escolha por diminuir a quantidade de falso-positivos, mas infelizmente não podem ser utilizados sempre devido ao N amostral, por isso é preciso cuidado ao avaliar os resultados apenas pelo FDR ajustado.

A expressão gene *WNT5a* resultado da técnica de qRT-PCR mostrou correlação significativa apenas com os genes diferencialmente expressos *SMAD3* e *PRKCI*. DI RENZO et al. (2016) mostrou em um estudo com células musculares lisas cultivadas que o *TGF- β /SMAD3* elevado aumenta a expressão de vários genes da via WNT. Investigando o crosstalk entre a sinalização de *TGF- β /SMAD3* e *WNT/ β -catenina* os autores observaram as

células tratadas com adenovírus expressando *SMAD3* seguido de estimulação com *TGF- β 1* regulou positivamente *WNT2b*, *WNT4*, *WNT9a*, *WNT11* aumentando a proteína β -catenina, o que sugere um novo mecanismo pelo qual o *TGF- β /SMAD3* elevado estimula a secreção de genes *WNTs* canônicos, assim como estudo de SHI et al. (2019). No entanto houve regulação positiva também em *WNT5a*, pertencente à via não canônica. O gene *WNT7a* não apresentou correlação significativa com nenhum dos genes diferencialmente expressos relacionados à via WNT. O gene *PRKCI* é um gene membro da família *PKC*, uma família que compreende pelo menos oito membros, que são expressos diferencialmente e são envolvidos em uma ampla variedade de processos celulares. QI et al. (2014) com objetivo de investigar a relação entre *WNT5a* e do mimetismo vasculogênico no câncer epitelial de ovário pela amostra de 79 pacientes, mostrou que a coloração da proteína *WNT5a* por imuno-histoquímica (diluição 1:100) foi significativamente correlacionada com metástases. Por outros métodos in vitro, como construção de plasmídeos, Western Blot e motilidade celular, os resultados mostraram que *WNT5a* aumentou a capacidade vasculogênica, motilidade e invasividade de células cancerosas, mas houve bloqueio desses efeitos pelo inibidor $PKC\alpha$ e não houve alteração em β -catenina, indicando que *WNT5a* foi associado com mimetismo vasculogênico e transição epitélio-mesênquima podendo estar ligado à via *PKC*.

O gene *RNF213* foi significativo quando comparado entre amostras normais e benignas com os tumores malignos. Alguns estudos, como de ER

et al. (2016) sugerem que a endometriose possa servir como precursora para alguns tipos de câncer de ovário, principalmente os endometrióides e de células claras. Os autores avaliaram 10 pacientes com amostras FPPE e macrodissecadas para avaliação de 409 genes relacionados à tumores de ovário associados à endometriose, onde o sequenciamento relevou diversos genes mutados, inclusive o *RNF213*. A família dos genes *RNF* são descritos como tendo papel importante na tumorigênese e progressão tumoral, como o *RNF13* que quando superexpresso aumenta o potencial invasivo e a atividade gelatinolítica do câncer pancreático levando a um aumento da atividade da metaloproteinase de matriz-9 (*MMP9*), ou ainda o *RNF183* importante na contribuição da progressão para a malignidade no câncer colorretal.

O microarray pode ser bastante útil para os diferentes tipos de genes que podem ser obtidos por diferentes plataformas de tecnologia e quando os rankings completos de RNAs´m não estão disponível, podendo validar ou confrontar dados de outras plataformas. YANG et al. 2018, em um estudo utilizando bioinformática integrada identificou os principais genes patogênicos envolvidos no câncer de ovário e seus potenciais mecanismos moleculares utlizaddo o banco de dados GEO (Gene Expression Omnibus) onde selecionaram 85 amostras de câncer de ovário e 30 amostras ovarianas normais. Para análise, os autores integraram os dados do microarray para obter genes DE, assim como realizado o enriquecimentos das vias de ontologia gênica (GO) e de KEGG. Na análise de GO foi visto que funções biológicas dos DEGs focavam na regulação da proliferação,

adesão e diferenciação e cascatas de sinal intracelular e que funções moleculares incluíam atividade do fator de crescimento, regulação de quinase, ligação ao DNA e atividade de transporte de oxigênio. Na análise da via KEGG os autores mostraram que os DEGs estavam envolvidos, dentre outras vias, na via de sinalização WNT, principalmente, concluindo que o uso de bioinformática poderia auxiliar não só no entendimento dos mecanismos moleculares, mas também na prevenção e diagnóstico.

No entanto, os genes transcritos diferencialmente expressos apresentaram diversas correlações estatisticamente significantes entre si (ver Tabela 18). Curiosamente, é possível observar que nem todos os genes da via não canônica possuem associação significativa positiva com o *WNT5a* e que nenhum gene da via canônica possui associação significativa positiva com o gene *WNT7a*, no entanto vários genes da via canônica possuem associação significativa negativa com alguns genes da via não canônica (ver Tabelas 18 e 19). Segundo GORDON e NUSSE (2006) a inibição da via canônica pela inibição do complexo β -cateninA-TCF/Let ocorre pela liberação de Ca^{+} que ativa *CamKII*. Isso corrobora a sugestão dos estudos de OLSON e GIBO (1998) e ISHITANI et al. (2003) que o gene *WNT5a* é antagonista da atividade canônica de WNT em *Xenopus* e embriões e células de mamíferos e também como é possível que HUANG et al. (2016) correlacionou de forma inversa a quimioresistência de ambas as vias. Porém ainda são necessários mais estudos sobre o funcionamento claro e direto da interação antagônica das vias WNT.

7 CONCLUSÕES

- O diagnóstico prévio de outros tumores, não apenas ginecológicos, se mostrou como um fator de risco que pode aumentar a chance de desenvolver câncer de ovário. O aumento do número de filhos, o uso de anticoncepcional e a idade avançada parecem aumentar a expressão de WNT5a. O aumento no número de filhos foi associado ao aumento da proteína WNT5a.
- Não houve concordância dos genes WNT5a e WNT7a entre si ou com diferentes estados clínicos. Houve correlação significativa das proteínas entre si, mostrando um possível crosstalk à nível proteico, descartando a hipótese que a expressão gênica sirva para validar a expressão proteica, obrigatoriamente.
- O ensaio global de expressão gênica mostrou que outros genes da via WNT podem estar associados à progressão tumoral, podendo ser também estudados a nível de expressão proteica por citologia líquida, e embora WNT5a e WNT7a não apresentem significância, obtivemos outros candidatos para estudos futuros.
- Os resultados da citologia líquida como premissa de diagnóstico permitem apenas uma conclusão definitiva em alguns critérios, com alta viabilidade de sucesso, no entanto novos estudos deverão envolver maior número amostral para validar os resultados, visando a pesquisa de rotina para diagnóstico precoce e um efetivo método diagnóstico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi J. A Pap-based test to detect endometrial and ovarian cancers early. **JAMA** 2018; 319:1853.

Anderson L, Seilhamer J: A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis** 1997; 18:533-7.

Anastas JN, Moon RT. WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nat Rev** 2013; 13:11-24.

Badiglian Filho L, Oshima CT, De Oliveira Lima F, et al. Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. **Oncol Rep** 2009; 21:313-20.

Belhocine M, Gernigon-Spychalowicz T, Jacob MP, Benazzoug Y, Exbrayat JM. Immunoexpression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in the seminal vesicles and ventral prostate of Libyan jird (*Meriones libycus*) during the seasonal cycle of reproduction. **Histol Histopathol** 2010; 25:619-36.

Berek JS, Friedlander M, Hacker NF. Epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. In: Berek JS, Hacker NF, editors. **Berek and Hacker's gynecologic oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p.443-92.

Bodnar L, Stanczak A, Cierniak S, et al. Wnt/ β -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. **J Ovarian Res** 2014; 7:16.

Brummer O, Böhmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kühnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. **Gynecol Oncol** 2002; 84:222-7.

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

Chan JK, Urban R, Cheung MK, et al. Ovarian cancer in younger vs older women: a population-based analysis. **Br J Cancer** 2006; 95:1314-20.

Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Mol Cell Proteomics** 2002, 1:304-13.

Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. **Cancer** 2003; 97(10 Suppl):2631-42.

Chu MM, Fishman D. Risk assessment for epithelial ovarian cancer: proposing a new approach to a deadly problem. **Scand J Clin Lab Invest Suppl** 2014; 244:63-7; discussion 66-7.

DiRenzo DM, Chaudhary MA, Shi X, et al. A crosstalk between TGF- β /Smad3 and Wnt/ β -catenin pathways promotes vascular smooth muscle cell proliferation. **Cell Signal** 2016; 28:498-505.

Ditto A, Leone Roberti Maggiore U, Bogani G, et al. Predictive factors of recurrence in patients with early-stage epithelial ovarian cancer. **Int J Gynaecol Obstet** 2019; 45:28-33.

Er TK, Su YF, Wu CC, et al. Targeted next-generation sequencing for molecular diagnosis of endometriosis-associated ovarian cancer. **J Mol Med (Berl)** 2016; 94:835-47.

Faber MT, Jensen A, Frederiksen K, et al. Oral contraceptive use and impact of cumulative intake of estrogen and progestin on risk of ovarian cancer. **Cancer Causes Control** 2013; 24:2197-206.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer incidence and Mortality Worldwilde. Lyon: International **Agency for Research on Cancer**; 2010. (IARC CancerBase n° 10). Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>>. [2018 set 27].

Grayson K, Gregory E, Khan G, Guinn BA. Urine biomarkers for the early detection of ovarian cancer - are we there yet? **Biomark Cancer** 2019; 11:1179299X19830977.

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome Biol** 2003; 4:117.

Gordon MD, Nusse R. Multiple receptors, and multiple WNT signaling: multiple pathways, transcription factors. **J Biol Chem** 2006; 281:22429-33.

Gwinn ML, Lee NC, Rhodes PH, Layde PM, Rubin GL. Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. **J Clin Epidemiol** 1990; 43:559-68.

He F, Xiong W, Yu X, et al. Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. **Development** 2008; 135:3871-9.

Heijink IH, de Bruin HG, Dennebos R, et al. Cigarette smoke-induced epithelial expression of WNT-5B: implications for COPD. **Eur Respir J** 2016; 48:504-15.

Hernandez Gifford JA. The role of WNT signaling in adult ovarian folliculogenesis. **Reproduction** 2015; 150:R137-48.

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

Hu J, Meng Y, Yu T, Hu L, Mao M. Ubiquitin E3 ligase MARCH7 promotes ovarian tumor growth. **Oncotarget** 2015; 6:12174-87.

Huang L, Jin Y, Feng S, et al. Role of Wnt/ β -catenin, Wnt/c-Jun N-terminal kinase and Wnt/ Ca^{2+} pathways in cisplatin-induced chemoresistance in ovarian cancer. **Exp Ther Med** 2016; 12:3851-8.

Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. **Clin Obstet Gynecol** 2012; 55:3-23.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. The Global Cancer Observatory-GLOBOCAN. **Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, worldwide, females, all ages**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2OrtPbG>> [2019 mar 27].

Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/ Ca^{2+} pathway to antagonize Wnt/ β -catenin signaling. **Mol Cell Biol** 2003; 23:131-9.

Kawamoto S, Matsumoto Y, Mizuno K, Okubo K, Matsubara K. Expression profiles of active genes in human and mouse livers. **Gene** 1996; 174:151-8.

KEEG-Kyoto **Encyclopedia of genes and genomes: Wnt signaling pathway - Homo sapiens (human)**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2IDx1Sq>> [2019 fev 16].

Kim HS, Kim TH, Chung HH, Song YS. Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis: a meta-analysis. **Br J Cancer** 2014; 110:1878-90.

Kinde I, Bettgowda C, Wang Y, et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. **Sci Transl Med** 2013; 5:167ra4.

Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis** 2008; 4:68-75.

La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **Eur J Cancer Prev** 2017; 26:55-62.

Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M, et al. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. **Eur Urol** 2002, 42:398-406.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Lee SH, Zhou S, Zhou T, Hong G. Sanger Sequencing for BRCA1 c.68_69del, BRCA1 c.5266dup and BRCA2 c.5946del Mutation Screen on Pap Smear Cytology Samples. **Int J Mol Sci** 2016; 17:229.

Lopes C. **Marcação inespecífica e métodos de bloqueio** – Pathologika. Disponível em: <https://bit.ly/2UYsZFJ> [Acesso em: 03/01/2019].

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20:781-810.

MacDonald BT1, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell** 2009; 17:9-26.

Marth C, Reimer D, Zeimet AG. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. **Ann Oncol** 2017; 28(suppl_8):viii36-viii39.

Meier-Abt F, Milani E, Roloff T, et al. Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. **Breast Cancer Res** 2013; 15:R36.

Meier-Abt F, Bentires-Alj M. How pregnancy at early age protects against breast cancer. **Trends Mol Med** 2014; 20:143-53.

Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin/TCF signaling depending on receptor context. **PLoS Biol** 2006; 4:e115.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018a.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Câncer de ovário**. Última modificação: 06/11/2018b. Disponível em: <URL:<https://bit.ly/2Fb5l3c>> [2019 jan 15].

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nat Rev Genet** 2004; 5:691-701.

Moore DS, Notz WI, Flinger MA. **A estatística básica e sua prática**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

Nagaraj AB, Joseph P, Kovalenko O, et al. Critical role of Wnt/ β -catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. **Oncotarget** 2015; 6:23720-34.

Nishita M, Yoo SK, Nomachi A, et al. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. **J Cell Biol** 2006; 175:555-62.

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell** 1982; 31:99-109.

Oehler MK, MacKenzie IZ, Wallwiener D, Bicknell R, Rees MC. Wnt-7a is upregulated by norethisterone in human endometrial epithelial cells: a possible mechanism by which progestogens reduce the risk of estrogen-induced endometrial neoplasia. **Cancer Lett** 2002; 186:75-81.

Oishi I, Suzuki H, Onishi N, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. **Genes Cells** 2003; 8:645-54.

Olivieri EH, Franco LA, Pereira RG, Mota LD, Campos AH, Carraro DM. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreserv Biobank** 2014; 12:46-52.

Olson DJ, Gibo DM. Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation. **Exp Cell Res** 1998; 241:134-41.

Orntoft TF, Thykjaer T, Waldman FM, Wolf H, Celis JE: Genomewide study of gene copy numbers, transcripts, and protein levels in pairs of non-invasive and invasive human transitional cell carcinomas. **Mol Cell Proteomics** 2002, 1:37-45.

Park HK, Schildkraut JM, Alberg AJ, et al. Benign gynecologic conditions are associated with ovarian cancer risk in African-American women: a case-control study. **Cancer Causes Control** 2018; 29:1081-91.

Pearce CL, Chung K, Pike MC, et al. Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin. **Cancer** 2009; 115:531-9.

Qi H, Sun B, Zhao X, et al. Wnt5a promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition via protein kinase C α in epithelial ovarian cancer. **Oncol Rep** 2014; 32:771-9.

Ramachandran I, Thavathiru E, Ramalingam S, et al. WNT inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis. **Oncogene** 2011; 31: 2725-37.

Rooth C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. **Br Nurs** 2013; 22:S23-30.

Rumsey D. **Estatística para leigos**. Rio de Janeiro: Alta Books; 2009.

Schock H, Surcel HM, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. Early pregnancy sex steroids and maternal risk of epithelial ovarian cancer. **Endocr Relat Cancer** 2014; 21:831-44.

Sheu BC, Lien HC, Ho HN, et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. **Cancer Res** 2003; 63:6537-42.

Shi Y, Zhang J, Liu M, Huang Y, Yin L. SMAD3 inducing the transcription of STYK1 to promote the EMT process and improve the tolerance of ovarian carcinoma cells to paclitaxel. **J Cell Biochem** 2019 120:10796-811.

Shoukri M. **Measures of interobserver agreement**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2010. (Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series)

Stanford Homepage. **Human Wnt genes**. Available from: <URL:<https://stanford.io/2UhnPKL>>. [2019 mar 2].

The Human Protein Atlas. **WNT5a**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2EFGHGv>>. [2019a mar 2].

The Human Protein Atlas. **WNT7a**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2Up7Mo5>>. [2019b mar 2].

Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent {beta}-catenin degradation. **J Cell Biol** 2003; 162:899-908.

Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbe NL, Suchanek E, Giudice LC. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:1453-61.

Trétarre B, Molinie F, Woronoff AS, et al. Ovarian cancer in France: Trends in incidence, mortality and survival 1980-2012. **Gynecol Oncol** 2015; 139:324-9.

Wang Y, Li L, Douville C, et al. Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers. **Sci Transl Med** 2018; 10:eaap8793

Wu G, Liu A, Zhu J, et al. MiR-1207 overexpression promotes cancer stem cell-like traits in ovarian cancer by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncotarget** 2015; 6:28882-94.

Yamamoto H, Yoo SK, Nishita M, Kikuchi A, Minami Y. Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. **Genes Cells** 2007; 12:1215-23

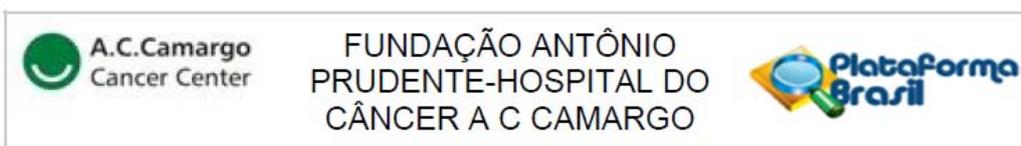
Yang Y, Liu L, Cai J, et al. DEPDC1B enhances migration and invasion of non-small cell lung cancer cells via activating Wnt/ β -catenin signaling. **Biochem Biophys Res Commun** 2014; 450:899-905.

Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams P. Downregulation of WNT signaling is an early signal for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. **Mol Cell** 2007; 20:183-96.

Yoshioka S, King ML, Ran S, et al. WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/ β -catenin pathway. **Mol Cancer Res** 2012; 10:469-82.

Yu WZ, Chen XM, Niu WB, Wang F, Sun B, Sun YP. Role of Wnt5a in the differentiation of human embryonic stem cells into endometrium-like cells. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:5478-84.

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação da expressão gênica e protéica de marcadores da via WNT em amostras endocervicais de tumores de ovário maligno e benigno.

Pesquisador: Levon Badiglian Filho

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 41190915.6.0000.5432

Instituição Proponente: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.353.554

Apresentação do Projeto:

Carta solicitando inclusão de metodologia HTA no projeto previamente aprovado.

Objetivo da Pesquisa:

Não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador enviou projeto incluindo a técnica HTA na análise para comparar com as técnicas que já estavam descritas no projeto inicial. O material coletado para essa análise será o mesmo que já descrito no projeto aprovado anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente. Foi apresentado um novo TCLE incluindo o HTA.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 1.353.554

Considerações Finais a critério do CEP:
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_617388 E1.pdf	28/10/2015 12:44:53		Aceito
Outros	Andamento_projeto.pdf	28/10/2015 12:44:06	Erika Regina Matheus Malentacchi	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_justificativa_HTA_assinada.jpg	28/10/2015 12:37:09	Erika Regina Matheus Malentacchi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Erika_HTA.pdf	28/10/2015 12:35:24	Erika Regina Matheus Malentacchi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/10/2015 12:34:01	Erika Regina Matheus Malentacchi	Aceito
Outros	Carta Resposta 2 - Abril.pdf	08/04/2015 11:04:30		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 2 - modelo para pesquisador preenchido.doc	08/04/2015 11:03:03		Aceito
Outros	Carta Resposta - Erika.doc	05/03/2015 15:08:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - modelo para pesquisador preenchido.doc	05/03/2015 15:06:00		Aceito
Outros	Formulário de Submissão - Erika - corrigido.doc	05/03/2015 15:03:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Doutorado - Erika Matheus Malentacchi - capa assinada.doc	05/03/2015 14:47:12		Aceito
Folha de Rosto	fr dr. levon.pdf	22/01/2015 11:36:55		Aceito
Outros	Formulário de submissão do projeto de pesquisa.docx	07/01/2015 17:27:12		Aceito
Outros	Orçamento completo - assinado.docx	07/01/2015 17:18:29		Aceito
Outros	Termo de Compromisso Dr. Levon 1.pdf	07/01/2015 17:09:06		Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE-HOSPITAL DO
CÂNCER A C CAMARGO



Continuação do Parecer: 1.353.554

Outros	Declaracao sobre Dados e Publicacao.pdf	07/01/2015 17:07:40		Aceito
Outros	Declaração Dr. Fernando Soares.pdf	07/01/2015 17:07:27		Aceito
Outros	Declaracao de uso e destino de material biologico.pdf	07/01/2015 17:06:34		Aceito
Outros	Declaração de Recrutamento 1.pdf	07/01/2015 17:06:14		Aceito
Outros	Declaracao de Publicacao de amostras do Biobanco.pdf	07/01/2015 17:05:21		Aceito
Outros	Declaracao de de infraestrutura e instalacoes.pdf	07/01/2015 17:05:11		Aceito
Outros	Declaracao de comprometimento Dr. Glauco.pdf	07/01/2015 17:05:03		Aceito
Outros	Curriculos Lattes - Orientador e aluna.pdf	07/01/2015 17:04:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Completo - Assinado.docx	07/01/2015 17:03:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Doutorado - Erika Matheus Malentacchi - capa assinada.doc	07/01/2015 16:40:15		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Dezembro de 2015

Assinado por:

Antonio Hugo Jose Froes Marques Campos
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Anexo 2 - Carta de colaboração da University of Southern Denmark



To whom it may concern:

Research Project: Comparação da expressão gênica e protéica de marcadores da via Wnt em amostras endocervicais de tumores de ovário maligno e benigno.

The experimental practice (expression arrays) and the data analysis of the above-mentioned study will be performed by Erika Regina Matheus Malentacchi in the Laboratory under my supervision at Vejle Hospital, University of Southern Denmark, Vejle, DK. This collaboration is performed between our group and Dr Levon Badiglian Filho. In particular, our aim is to molecularly characterize the expression profile of ovary tumors. To develop the study, Erika and her supervisor, Dr Badiglian-Filho will be responsible for bringing the samples to the laboratory. We declare that exceeding material (RNA) will be discharged after the conclusion of this study.

We also affirm that we agree on supervising Erika Regina Matheus Malentacchi during her activities in my laboratory and emitting a final report with the results.

Please do not hesitate to contact us if you have any questions or need any further information.

Best regards,



Silvia Regina Rogatto, MSc, PhD, Professor

Email: silvia.regina.rogatto@rsyd.dk

Department of Clinical Genetics, Vejle Hospital

University of Southern Denmark

Denmark

Anexo 3 - Carta de estágio realizado no Departamento de Genética Clínica da University of Southern Denmark



Vejle Sygehus
- en del af Sygehus Lillebælt
Department of Clinical Genetics
Vejle Hospital, Vejle, Denmark
Beriderbakken 4, 7100 Vejle · DK
Direkte tlf. 0045 7940 6669

December 17th, 2018.

Ref. Research Project: WNT pathway In endocervical samples from ovary tumors

PhD student: Erika Regina Matheus Malentacchi

I certify that the Erika Regina Matheus Malentacchi (Advisor: Dr Levon Badiglian Filho, co-advisor: Silvia R Rogatto), Graduation Program in Science (Oncology), AC Camargo Cancer Center, SP Brazil visit our Institution (Vejle Hospital, Institute of Regional Health Research) to develop a set of experiments at Clinical Genetics during December 7 to 18th, 2018.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Silvia Rogatto', with a horizontal line extending from the end of the signature.

Silvia Regina Rogatto, MSc, PhD, Professor
Department of Clinical Genetics
Vejle Hospital
Institute of Regional Health Research
University of Southern Denmark
Beriderbakken 4, 7100 Vejle - DK
silvia.regina.rogatto@rsyd.dk
Direkte tlf. 0045 7940 6669

The logo for Region Syddanmark features a stylized graphic of a person or a figure, followed by the text 'Region Syddanmark' in a sans-serif font.

Region Syddanmark

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
Comparação da expressão gênica e proteômica de marcadores da via WNT em amostras endocervicais de tumores de ovário maligno e benigno.
- PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
Dr. Levon Badiglian Filho
- PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
Aluna Doutoranda: Erika Regina Matheus Malentacchi
Co-orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha
Co-orientadora: Dra. Louise de Brot Andrade
- DURAÇÃO DA PESQUISA:
42 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa "**Comparação da expressão gênica e proteômica de marcadores da via WNT em amostras endocervicais de tumores de ovário maligno e benigno**" que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

Os participantes são convidados a participar no momento anterior a que submeterão a cirurgia, no hospital Ac. Camargo. Se disponíveis, poderão aceitar e assinar o termo no ambulatório.

Rúbrica do pesquisador responsável:

VERSÃO DE 13/08/2014

Rúbrica do participante:

PÁGINA 1 DE 3

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** (011) 2189-5000 – ramais: 5110, entrar em contato com **Dr. Levon Badiglian Filho**.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr. Levon Badiglian Filho
Departamento de Ginecologia Oncológica do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramais 5110
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida:

Assinatura do participante ou responsável legal

Data



Assinatura do responsável pela pesquisa

Dr. Levon Badiglian Filho

Data

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo deste estudo consistirá em investigar, em pacientes portadoras de massa anexial, alguns possíveis marcadores tumorais para saber se há diferença de marcação entre os tumores ovarianos benignos e malignos e também não-tumores.

V - JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O câncer de ovário é hoje responsável por 4% de todos os cânceres femininos. São tumores de difícil diagnóstico e quando diagnosticados a maioria das pacientes encontra-se em estágios avançados, tornando-o de difícil diagnóstico, atingindo na maioria dos casos mulheres com idade superior a 50 anos. Apenas no Brasil, em 2014, são esperado 5.680 novos casos. Os aspectos ainda incertos do câncer de ovário e da ausência de mais testes efetivos no rastreamento e detecção precoce leva a um aumento da mortalidade e morbidade. Isso destaca a necessidade de sensibilizar os pesquisadores para novos métodos de auxílio prognóstico e diagnóstico, como os marcadores bioquímicos e moleculares que se tornam variáveis cada vez mais importantes.

VI – DESENHO DA PESQUISA

A população a ser pesquisada será pacientes portadoras de massa anexial. Será realizado um estudo exploratório prospectivo, onde a técnica de amostragem escolhida é a de Amostra Não Aleatória Consecutiva, onde serão coletadas amostras realizadas no centro cirúrgico. Os critérios de inclusão serão as pacientes do hospital AC Camargo, submetidas à laparotomia ou laparoscopia com posterior diagnóstico histopatológico para tumor ovariano maligno, benigno ou ovários normais com ausência de neoplasia.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Será aplicada um questionário para posterior comparação com os fatores de risco já estabelecidos na literatura. Após questionário, que levará um tempo médio de 2 minutos, e autorização deste termo (TCLE), será realizada coleta de esfregaço endometrial por um método convencional, semelhante ao exame preventivo. A coleta será no pré-operatório imediato, logo após a realização da anestesia. As amostras coletadas e preparadas serão enviadas ao laboratório, e passarão por técnicas de Imunocitoquímica para expressão proteica e por PCR em tempo real para expressão gênica. O paciente poderá não responder alguma questão do questionário caso não se sinta confortável ou constrangido para tal, e não precisará retornar ao hospital para outros procedimentos referentes a este estudo.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DA PESQUISA

O projeto não apresenta desconforto ou risco para as pacientes. A coleta é simples, rápida e indolor e será realizada com a paciente já anestesiada. Os pesquisadores estarão disponíveis para conversar e prestar apoio se necessários, frente a qualquer situação.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Os benefícios poderão ser obtidos a longo prazo, beneficiando pacientes com câncer de ovário, no que diz respeito a prevenção e prognóstico.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Rúbrica do
pesquisador
responsável:



Rúbrica do
participante:

Apêndice 2 – Formulários de alteração de título



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Formulário de Solicitações

Eu, Erika Regina Matheus Malentacchi, Nível Doutorado, orientando(a) do(a) Dr(a) Levon Badiglian Filho solicito:

Mudança de Título

Se houver alteração no Conteúdo do Projeto – Anexar cópia do projeto para a CPG e para o Comitê de Ética

De: Comparação da expressão gênica e proteica de marcadores da via WNT em amostras endocervicais de tumores de ovário maligno e benigno.

Para: O USO DO ESFREGAÇO CÉRVICO-VAGINAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE MARCADORES DA VIA WNT ASSOCIADOS A TUMORES DE OVÁRIO

Co-Orientação Dr(a) _____

Anexar currículo do co-orientador caso ainda não seja credenciado no programa.
Anexar carta de aceite do Co-orientador pretendido.

Trancamento Período: _____ meses

.o

Cancelamento de Matrícula em Disciplina

Anexar carta para o professor responsável pela disciplina justificando o cancelamento. Antes de transcorrido 25% do total das aulas dadas.

Validação de Crédito

Anexar Declaração da Instituição (contendo conceito, carga horário, frequência) e Programa da Disciplina.

Auxílio Financeiro

Anexar solicitação contendo Nome do Congresso, Local, Período e Título do Trabalho a ser apresentado (Valor da Passagem Aérea, Inscrição, Diária, Transporte e Refeição).

Justificativa de ausência nas reuniões de quarta-feira

As faltas não serão abonadas.

Outro _____

Anexar justificativa

São Paulo, 15/01/2019

_____, na Reunião do Conselho em
____/____/____.

Carimbo e Assinatura do Presidente do Conselho de Pós-Graduação

Dr. Levon Badiglian Filho
Orientador

Erika Regina Matheus Malentacchi
Aluna

Eu, Erika Regina Matheus Malentacchi, Nível Doutorado, orientando(a) do(a) Dr(a) Levon Badiglian Filho solicito:

Mudança de Título

Se houver alteração no Conteúdo do Projeto – Anexar cópia do projeto para a CPG e para o Comitê de Ética

De: Comparação da expressão gênica e proteica de marcadores da via WNT em amostras endocervicais de tumores de ovário maligno e benigno.

Para: **O USO DO ESFREGAÇO CÉRVICO-VAGINAL PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE MARCADORES DA VIA WNT ASSOCIADOS A TUMORES DE OVÁRIO**

Co-Orientação Dr(a)

Anexar currículo do co-orientador caso ainda não seja credenciado no programa.
Anexar carta de aceite do Co-orientador pretendido.

Trancamento Período: _____ meses

.0

Cancelamento de Matrícula em Disciplina

Anexar carta para o professor responsável pela disciplina justificando o cancelamento. Antes de transcorrido 25% do total das aulas dadas.

Validação de Crédito

Anexar Declaração da Instituição (contendo conceito, carga horário, frequência) e Programa da Disciplina.

Auxílio Financeiro

Anexar solicitação contendo Nome do Congresso, Local, Período e Título do Trabalho a ser apresentado (Valor da Passagem Aérea, Inscrição, Diária, Transporte e Refeição).

Justificativa de ausência nas reuniões de quarta-feira

As faltas não serão abonadas.

Justificativa de ausência nas reuniões de quarta-feira

As faltas não serão abonadas.

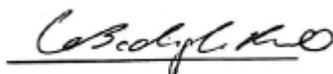
Outro

Anexar justificativa

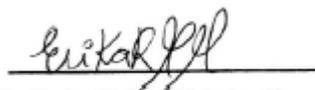
São Paulo, 15/01/2019

_____, na Reunião do Conselho em
____/____/____.

Carimbo e Assinatura do Presidente do Conselho de Pós-Graduação



Dr. Levon Badiglian Filho
Orientador



Erika Regina Matheus Malentacchi
Aluna