

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE
MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS
EM NEOPLASIAS OVARIANAS EPITELIAIS**

MARCELO HAJIME KOHAYAGAWA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Co-Orientadores: Dr. Gilles Landman

Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Kohayagawa, Marcelo Hajime

Análise da expressão protéica de marcadores de células-tronco tumorais em neoplasias ovarianas epiteliais / Marcelo Hajime Kohayagawa - São Paulo, 2010.

75p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: CÂNCER DE OVÁRIO. 2. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR 3. CÉLULAS TRONCO. 4. IMUNOISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre apoiaram e estiveram torcendo por mim para a conclusão desta tese.

"Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.."

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

A Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen, minha orientadora, pela inesgotável paciência, disponibilidade, perseverança e incentivo à pesquisa. Sua presença foi muito importante para desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Gilles Landman, meu co-orientador, por ter despertado meu interesse e aumentado meu conhecimento na área de Anatomia Patológica antes nunca conhecida por mim. Sua experiência foi fundamental para o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Marcello Ferretti Fanelli meu constante mestre na prática da Oncologia Clínica, pelo incentivo à iniciação do mestrado nesta Instituição e por ter permitido usufruir de toda infra-estrutura no Departamento de Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pelo apoio do Departamento de Anatomia Patológica na execução deste trabalho.

A Dra. Cynthia Aparecida B. T. Osório e Dra. Joema F. Lima pelo pioneirismo na pesquisa de células-tronco tumorais nesta Instituição.

A Dra. Marcilei Elisa C. Buim pela sua grande contribuição na interpretação dos dados de imagem e intensa dedicação neste trabalho.

Ao Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima, Dr. Celso A. Lopes de Mello e Dr. Aldo Lourenço Abbade Dettino pela grande contribuição em idéias, críticas e opiniões neste trabalho.

Ao Dr. Glauco Baiocchi Neto, por compartilhar o banco de dados clínicos do Departamento de Ginecologia.

Ao Dr. Marcelo Oliveira dos Santos, Diretor Médico do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital Santa Catarina pelo apoio, compreensão e instigantes observações sobre a prática clínica na oncologia.

À Dra. Inês N. Nishimoto, pelo auxílio na análise estatística.

Ao Dr. Rafael M. Rocha por ter cedido espaço no laboratório e reagentes.

Ao Sr. Carlos Ferreira Nascimento e Sr. Severino da Silva Ferreira pela realização do *Tissue Microarray*

À Sra. Suely Francisco e toda equipe da biblioteca pela dedicação e exaustivo trabalho na biblioteca da Fundação Antônio Prudente.

Ao Sr. Ronald de Sousa Tamborelli e Sr. Lafaete Teixeira Júnior pelo apoio técnico e pela amizade no Departamento de Oncologia Clínica.

A Sra. Ana Maria Kuninari coordenadora da pós-graduação desta Instituição e sua equipe pela disponibilidade e atenção ao aluno.

Ao Sr. Hidemi Saito e Sr. Maurício H. Navate pela disponibilidade e paciência na formatação das aulas.

Ao Sr. Rômulo A. Miyamura, Sra. Suely Nonogaki, Sr. José Ivanildo Neves pelo valioso auxílio técnico no Departamento de Anatomia Patológica.

À Dra. Denise Sayeg e Dr. Kleber Sayeg que sempre tiveram uma participação importante da minha vida médica.

À Dra. Samantha Severino Cabral Costa pelo companheirismo na disciplina de Cuidados Paliativos e Patologia dos Tumores.

À Dra. Laura Mannarini. Apesar de conhecê-la a pouco tempo, foi de grande importância para o incentivo no pensamento positivo para a conclusão desta tese.

Aos meus irmãos Márcia Yukie e Marcos Massayuki Kohayagawa e sobrinho Henrique Hideki S. Kohayagawa pelo companheirismo.

À Sra. Severina Martin Calore pelo apoio espiritual e orações.

As pacientes do Hospital A.C. Camargo que contribuíram na realização deste trabalho para o engrandecimento e progresso da medicina.

RESUMO

Kohayagawa MH. **Análise da expressão protéica de marcadores de células-tronco tumorais em neoplasias ovarianas epiteliais**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Muita atenção tem sido dada no papel das células-tronco tumorais (CTTs) na iniciação e progressão de tumores sólidos. Determinados antígenos têm demonstrado ser marcadores de CTTs. Como os carcinomas epiteliais de ovário possuem uma heterogeneidade histopatológica e a grande maioria das pacientes apresenta recorrência da doença após quimioterapia, a identificação das CTTs pela expressão antigênica poderia contribuir para o conhecimento de seu papel na carcinogênese e desenvolvimento de novas terapias. **Objetivos:** analisar a expressão de marcadores de CTTs (CD133, Nestina, AP-2 γ , CD44 e CD117) em tumores epiteliais benignos, *borderlines* e malignos e correlacionar com parâmetros clínico-patológicos. **Metodologia:** Foi realizado a técnica de imunoistoquímica em 99 casos de neoplasia epitelial de ovário para as proteínas CD133, Nestina, AP-2 γ , CD31, CD44 e c-Kit em de tumores epiteliais de ovário incluídos em dois *Tissue Microarray* (TMA). **Resultados.** Alta expressão da proteína Nestina foi associada a tumores malignos ($p=0,049$) e com metástase tumoral ($0,087$). A alta expressão de c-Kit associou-se a tumores metastáticos ($p=0,0366$). Baixa expressão de CD44 e AP-2 γ foi associada ao baixo estágio clínico ($p=0,0025$ e $p=0,0004$, respectivamente) e a tumores sem metástase ($p=0,0137$ e $p=0,0026$, respectivamente), tumores bem/moderadamente diferenciados ($p=0,0274$ e $p=0,0263$), a tumores unilaterais ($p<0,0001$, ambos). A expressão da proteína CD133 não mostrou associação com os parâmetros analisados. Em relação à sobrevida global, pacientes com alta expressão de c-Kit e CD133 tiveram menor da sobrevida ($p= 0,0004$ e $p=0,0269$, respectivamente) e pacientes com alta expressão de CD44 e AP-2 γ apresentaram melhor sobrevida ($p=0,0221$ e $p=0,0269$, respectivamente). Para sobrevida livre de progressão, pacientes com pior sobrevida foram aqueles com baixa expressão de CD44 ($p=0. 0021$). **Conclusões:** Sugerimos com esse trabalho que as proteínas relacionadas às CTTs estão presentes

em vários tipos de tumores epiteliais de ovário e podem ser uma ferramenta útil para avaliar o prognóstico desses tumores. Embora os marcadores avaliados neste trabalho estejam relacionados à presença de CTTs, não podemos afirmar com certeza que essa população de células seja realmente CTT.

SUMMARY

Kohayagawa MH. [Analysis of protein expression of tumor stem cell markers in epithelial ovarian neoplasms]. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Recently much attention has been given to the role of tumor stem cells (TSC) in the initiation and progression of solid tumors. Various antigens have been shown to be markers for TSC. As ovarian epithelial carcinomas are histopathologically heterogeneous, and a large majority of patients have recurrence of their disease after chemotherapy, identification of TSC by their antigen specificity would be very helpful in understanding their role in cancer initiation as well as in development of new therapies. **Objectives:** To analyze the expression of the following TSC markers (CD133, Nestin, AP-2 γ , CD44 and CD117) in benign, borderline and malignant epithelial ovarian tumors, and to correlate these findings with clinical and pathological parameters. **Methods:** Protein expression of CD133 in 99 epithelial ovarian neoplasms, Nestin, AP-2 γ , CD31, CD44 and c-Kit were evaluated using immunohistochemical methods, by two *Tissue Microarray* (TMA). **Results:** Higher levels of Nestin expression were found in malignant tumors ($p=0.0499$), with tumor metastasis (0.0087). The protein expression of c-Kit showed statistical significance only in relation to metastatic capacity ($p=0.0366$). Low expression of CD44 and AP-2 γ were linked to early initial clinical stage ($p=0.025$ and $p=0.004$, respectively). They were associated with tumors without metastasis ($p=0.0137$ and 0.026 , respectively). Low expression of CD44 and AP-2 γ were also associated with moderately well differentiated and well differentiated tumors ($p=0.0274$ e $p=0.0263$) and to one-side tumors ($p<0.0001$). There was no association between the clinical and pathological variables with the expression of CD133. In relation to overall survival (OS), patients with high expression of c-Kit and CD133 had low survival ($p=0.0004$ and $p=0.0269$, respectively) and patients with high expression of CD44 and AP-2 γ showed better OS ($p=0.0221$ e $p=0.0269$, respectively). For disease free survival (DFS), patients with a shorter survival time were those who had a low

expression of CD44 ($p=0.0021$). **Conclusions:** This study has shown that proteins related to TSC are present in various types of ovarian epithelial tumors: their expression characteristics could be a useful marker for prognosis in these tumors. Although the markers evaluated in this study have been associated with the presence of TSC, it is impossible to state with absolute certainty that it is TSC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Origem das células-tronco tumorais.....	10
Figura 2	Representação esquemática da montagem do TMA (<i>Tissue MicroArray</i>).....	23
Figura 3	Análise representativa da reação de imunoistoquímica, mostrando expressão positiva da proteína CD133 em tumores epiteliais benignos de ovário.....	31
Figura 4	Análise representativa da reação de imunoistoquímica, mostrando expressão positiva da proteína CD133 em tumores epiteliais <i>borderline</i> de ovário.....	31
Figura 5	Análise representativa da reação de imunoistoquímica, mostrando expressão positiva da proteína CD133 em tumores epiteliais malignos de ovário.....	32
Figura 6	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína Nestina.....	35
Figura 7	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína c-Kit em tumores epiteliais de ovário.....	37
Figura 8	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão da proteína CD44 em tumores de epiteliais de ovário.....	39
Figura 9	Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína AP-2 γ em tumores epiteliais de ovário.....	42
Figura 10	Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando os tipos patológicos.....	44
Figura 11	Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando a lateralidade dos tumores.....	45
Figura 12	Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando graduação histológica.....	46
Figura 13	Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando o estadiamento clínico.....	46

Figura 14	Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando a invasão tumoral.....	47
Figura 15	Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína c-Kit....	48
Figura 16	Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína CD133.....	48
Figura 17	Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína CD44..	49
Figura 18	Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína AP-2 γ	49
Figura 19	Curvas de sobrevida livre de recidiva em 5 anos de pacientes portadoras de neoplasias epiteliais de ovário em relação a expressão da proteína CD44.....	50

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Classificação histológica das neoplasias epiteliais de ovário.....	4
Tabela 1	Anticorpos, clones, fontes, diluição e tipo recuperação antigênica utilizadas para a técnica de imunoistoquímica.....	25
Tabela 2	Características demográficas e clínico-patológicas das pacientes portadoras de tumores epiteliais de ovário.....	29
Tabela 3	Medidas de tendência central e de variabilidade da expressão de cada marcador.....	33
Tabela 4	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão CD133.....	34
Tabela 5	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão de Nestina.....	36
Tabela 6	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão c-Kit.....	38
Tabela 7	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão CD44.....	40
Tabela 8	Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão AP-2 γ	43
Tabela 9	Probabilidade de Sobrevida Livre de recidivas 5-anos de acordo com variáveis demográficas e clínico-patológicas.....	51
Tabela 10	Análise univariada. Risco relativos (RR) para morte e respectivos intervalos de confiança de 95% estimados pelo modelo de regressão de Cox.....	52
Tabela 11	Fatores prognósticos independentes - Riscos relativos para morte e respectivos intervalos de confiança de 95% estimados pelo modelo de regressão de Cox.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ALDH1	Aldéido desidrogenase da família 1
AP-2γ	Fator de transcrição AP-2 gama
CA125	Antígeno cancerígeno 125
CD133	Antígeno CD133, Prominina
Dp	Desvio padrão
CTT	Células-tronco tumorais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EpCam	Molécula de adesão epitelial celular
ESA	<i>Epithelial specific antigen</i>
HER2/neu	Oncogene ERBB2/Neuraminase
H&E	Hematoxilina e eosina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IHC	Imunoistoquímica
L	Litro
LSAB	<i>Labeled Streptavidin Biotin</i>
Min	Minuto
Mol	Molar
MUC18	Mucina 18
μM	Micrômetro
Nanog	Fator de transcrição homeobox Nanog
Oct-3/4	Fator de transcrição ligado ao octâmero 3/4
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Prom-1.s1	Prominina variante 1
Prom-1.s2	Prominina variante 2
TGF-2	Fator transformador de crescimento 2
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de ovário: visão geral de epidemiologia, patologia e tratamento	1
1.2	Células-tronco tumorais (CTT).....	7
1.3.	Marcadores moleculares para células-tronco tumorais	11
1.4	Células-tronco tumorais e tumor de ovário.....	16
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivo específico	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Amostras de tecidos e caracterização das pacientes	21
3.2	Critérios de inclusão.....	21
3.3	Critérios de exclusão.....	22
3.4	Construção do <i>Tissue Microarray</i> (TMA)	22
3.5	Imunoistoquímica (IHC).....	23
3.6	Interpretações das reações de imunoistoquímica	25
3.7	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Associações entre expressão dos marcadores e parâmetros clínico-patológicos	30
4.2	Análise da sobrevida global em 5-anos.....	43
4.3	Análise da sobrevida livre de recidiva em 5-anos.....	50
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE OVÁRIO: VISÃO GERAL DE EPIDEMIOLOGIA, PATOLOGIA E TRATAMENTO

O câncer de ovário é o sexto tumor mais freqüente na população geral (PARKIN et al. 2005), sendo considerada a décima causa de morte por câncer no mundo (PARKIN et al. 2005, JEMAL et al. 2009). As maiores taxas de incidência são observadas na América do Norte e na Europa (World Health Organization - WHO 2008). No Brasil, o câncer de ovário não consta das estimativas nacionais mais recentes de incidência ou mortalidade. Em estimativa para o ano 2000, esperava-se que o câncer de ovário fosse a 15ª causa de morte por câncer em mulheres brasileiras (Ministério da Saúde 2008).

Os tumores ovarianos originam-se na sua maioria do: (1) epitélio celômico superficial, que dá origem ao epitélio mülleriano, às tubas uterinas (células colunares ciliadas serosas), ao revestimento endometrial (células colunares aciliadas) ou às glândulas endocervicais (células aciliadas mucinosas); (2) células germinativas, que migram para o ovário a partir do saco vitelino e são células pluripotenciais; e (3) estroma do ovário, que inclui os cordões sexuais (ABELOFF et al. 2004, COTRAN et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Os principais tipos celulares do epitélio celômico superficial são: (1) epitélio seroso, contém glândulas similares às da tuba uterina; (2) epitélio mucinoso, contém

glândulas similares às do colo uterino; (3) epitélio endometrióide, apresenta glândulas similares às do endométrio.

Existem inúmeros tipos de neoplasias epiteliais de ovário, sejam benignas, *borderlines* ou malignas (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004).

Aproximadamente 80% dos tumores ovarianos são benignos e ocorrem, sobretudo, em mulheres jovens entre 20 e 45 anos de idade (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004; MENON et al. 2005). Os tipos histológicos mais comuns de neoplasias benignas epiteliais do ovário, segundo o Comitê de Junta Americana sobre o Câncer (AJCC) (FLEMING et al. 2010), são: cistoadenoma seroso, cistoadenoma mucinoso, cistoadenoma endometrióide, tumores de células claras benignos e Tumor de Brenner (Quadro 1).

As neoplasias epiteliais de ovário de malignidade limítrofe ou de baixo grau de malignidade (*borderline*) formam uma entidade separada dentro do grupo de tumores ovarianos. Diferenciam-se das benignas e malignas por apresentarem as seguintes características: 1) ausência de invasão estromal dentro do ovário; 2) múltiplas camadas epiteliais; 3) atividade mitótica aumentada; 4) atipia nuclear (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004). Apesar de células do tumor primário do ovário poderem se alojar dentro da cavidade peritoneal causando implantes que envolvem intestino, omento e abdômen superior, as neoplasias de ovário epiteliais *borderline* possuem baixo potencial de malignidade, sendo consideradas indolentes (CADRON et al. 2007). A idade média ao diagnóstico é 40 anos. A sobrevida global em 5 anos para os estádios iniciais (estádio I e II) é de aproximadamente 98% e para os estádios mais avançados (estádio III e IV) varia entre 86% e 92% (CADRON et al. 2007; ABELOFF et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008). Podem ser associadas

com lesões extra-ovarianas em 35% das pacientes (ABELOFF et al. 2004; CADRON et al. 2007).

Os tipos histológicos mais comuns dos tumores *borderlines* são: seroso (50%), mucinoso (46%), endometrióide, células claras, tumor de Brenner e epitelial misto (3,9%) (Quadro 1) (FLEMING et al. 2010).

Os tumores malignos são mais comuns nas mulheres idosas entre 40 e 65 anos de idade (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004; MENON et al. 2005). Aproximadamente 70% das neoplasias epiteliais do ovário são diagnosticadas com doença avançada, que raramente é curável (EAGLE e LEDERMANN 1997; MENON et al. 2005; ARMSTRONG et al. 2006; OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007; CANNISTRA et al. 2008). Aproximadamente 90% das neoplasias primárias originam-se no epitélio celômico (COTRAN et al. 2004; ABELOFF et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Os principais tipos histológicos epiteliais malignos incluem: seroso, mucinoso, endometrióide, células claras, tumor de Brenner, carcinoma indiferenciado e epitelial misto (Quadro 1) (FLEMING et al. 2010).

Quadro 1 - Classificação histológica das neoplasias epiteliais de ovário.

Tipos Tumorais	Benigno	Borderline	Maligno
Tumores Serosos	cistoadenoma seroso	cistoadenoma seroso <i>borderline</i>	cistoadenocarcinoma seroso
Tumores Mucinosos	cistoadenoma mucinoso	cistoadenoma mucinoso <i>borderline</i>	cistoadenocarcinoma mucinoso
Tumores Endometrióides	cistoadenoma endometrióide	Cistoadenoma mucinoso <i>borderline</i>	cistoadenocarcinoma endometrióide
Tumores de Células Claras	tumores de células claras benignos	Tumores de células claras <i>borderline</i>	cistoadenocarcinoma de células claras
Tumores de Brenner	Brenner benigno	Brenner <i>borderline</i>	Brenner maligno / de células transicionais
Tumores de Células Escamosas	ausente	ausente	presente
Carcinoma Indiferenciado	ausente	ausente	presente
Tumor Epitelial Misto	presente	presente	presente

Fonte: FLEMING et al. (2010)

Os tumores serosos constituem o tipo mais comum de neoplasia ovariana epitelial (ABELOFF et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008). Cerca de 75% destes são benignos ou de malignidade limítrofe e 25% são malignos. Os cistoadenocarcinomas serosos respondem por aproximadamente 40% de todos os cânceres do ovário. Estão associados, frequentemente, com elevação do CA 125 (antígeno cancerígeno). CA-125 é uma glicoproteína de alto peso molecular que se encontra elevada no sangue em mais de 80% das pacientes com carcinomas epiteliais de ovário malignos. Existe também em fluídos de secreção peritoneal e pleural. Esse marcador tumoral é sensível em monitorar resposta ao tratamento e desenvolvimento de doença recorrente em pacientes que possuem níveis elevados (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Os tumores mucinosos são muito semelhantes aos serosos, sendo menos comuns e correspondendo a cerca de 25% de todas as neoplasias do ovário e de 7 a 14% de todos os cânceres ovarianos epiteliais. Oitenta por cento são benignos ou

limítrofes e cerca de 15% são malignos (HESS et al. 2004). Como os tumores serosos, os mucinosos de ovário podem comprometer as superfícies peritoneais e determinar acúmulo de material mucinoso semelhante ao do cisto dentro da cavidade peritoneal (COTRAN et al. 2004).

Tumores endometrióides são responsáveis por cerca de 20% das neoplasias ovarianas. Por razões desconhecidas, 15 a 30% dos carcinomas endometrióides são acompanhados por carcinoma do endométrio e o prognóstico relativamente bom nesses casos sugere que os dois podem surgir independentemente e não por disseminação metastática um do outro (COTRAN et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Adenocarcinoma de células claras é um tipo incomum de tumor do epitélio superficial ovariano. Pode ser predominantemente sólido ou cístico. O índice de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 50% quando os tumores estão restritos aos ovários; todavia estes tumores tendem a ser agressivos e uma sobrevida de 5-anos é rara quando há propagação para além do ovário (COTRAN et al. 2004).

Os tumores de Brenner são adenofibromas incomuns onde o componente epitelial consiste em nichos de células de transição lembrando aquelas que revestem a bexiga. A grande maioria destes tumores é benigna, porém foram descritas variantes *borderlines* e malignas (COTRAN et al. 2004).

O carcinoma indiferenciado é um tumor maligno de estrutura epitelial que possui diferenciação muito pobre para ser classificado em outro grupo (FLEMING et al. 2010).

O tumor epitelial misto é um tumor composto por dois ou mais tipos celulares de tumores epiteliais comuns (FLEMING et al. 2010).

O tipo histológico e o grau de diferenciação são importantes fatores prognósticos. As mulheres com tumores limítrofes possuem excelente prognóstico, mesmo quando há doença extra-ovariana. Pacientes com câncer de ovário invasivo bem-diferenciado (grau histológico I) e moderadamente diferenciado (grau histológico II) têm prognóstico melhor do que aquelas com tumores pouco diferenciados ou indiferenciados (grau histológico III) (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Em todos os carcinomas epiteliais de ovário pode haver ascite volumosa quando os tumores atravessam a cápsula tumoral e se implantam na cavidade peritoneal. Os linfonodos regionais são frequentemente comprometidos, podendo-se encontrar metástase pleural, hepática, pulmonar, no trato gastrointestinal e em outros locais (ABELOFF et al. 2004; COTRAN et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Os carcinomas ovarianos são tumores quimiossensíveis e numerosos agentes quimioterápicos têm levado a maiores chances de cura na adjuvância (MARKMAN e BOOKMAN 2000; ABELOFF et al. 2004; OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007). Atualmente, a combinação de carboplatina e paclitaxel constitui regime padrão para câncer ovariano epitelial avançado (OZOLS 2006; ARMSTRONG et al. 2006; GALLIGIONI et al. 2006), resultando em uma taxa de remissão completa em aproximadamente 75% do total de pacientes (MARKMAN e BOOKMAN 2000; OZOLS 2006; PIGNATA et al. 2006; GALLIGIONI et al. 2006; MÖBUS et al. 2007). Além disto, a combinação desses dois quimioterápicos tem melhorado a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global. A sobrevida livre de progressão (tempo entre o início do tratamento e a recidiva ou óbito sem recidiva) varia entre 16 a 21 meses dependendo do volume da doença e do tempo em que a quimioterapia foi

iniciada (OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007). A sobrevida global (tempo entre o início do tratamento e o óbito) varia entre 24 a 60 meses e é dependente também do volume da doença no diagnóstico (OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007).

Apesar da atividade da carboplatina, muitas pacientes apresentam recorrência da doença após o uso deste quimioterápico em primeira linha. A recorrência é frequentemente manifestada pelo aumento do CA125, apesar da ausência de sintomas ou evidência objetiva da doença avaliada pelo exame físico ou tomografias (ABELOFF et al. 2004, CANNISTRA et al. 2008).

1.2 CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS (CTT)

O câncer é uma doença multigênica, que de maneira geral representa descontrolada proliferação, diferenciação e metástase. Vários pesquisadores têm explicado o processo de iniciação e progressão do câncer por meio do modelo estocástico, cuja hipótese é a de que um grupo de células torna-se tumorigênica depois de sofrer mutações somáticas ou germinativas. O acúmulo dessas mutações resulta em proliferação e vantagem na sobrevida dos clones selecionados. Estes apresentam capacidade de produzir células cancerosas idênticas para manter o tumor e conservam a capacidade de iniciar outro tumor depois de transplantados em modelos animais. O modelo estocástico assume que o câncer é composto de clones com similar proporção de crescimento, que apresenta um padrão morfológico homogêneo e que dentro dele todas as células poderiam iniciar e propagar o tumor (SENGUPTA e CANCELAS 2010; MAENHAUT et al. 2010).

Em relação ao modelo estocástico existem duas importantes limitações, baseadas em observações e dados experimentais. Primeiro, os tumores são morfológico e funcionalmente heterogêneos. As mutações genéticas no contexto de monoclonalidade de muitos cânceres podem não explicar essa heterogeneidade celular. Segundo, o modelo estocástico diz que todas as células são capazes de iniciar um tumor. Mas modelos experimentais afirmam que nem todas as células do tumor apresentam essa capacidade (SCHATTON et al. 2009; SENGUPTA e CANCELAS 2010).

Nos últimos anos, modelos alternativos da evolução do câncer têm sido propostos. Um deles estabelece a existência de células programadas e re-programadas, chamadas de células-troncos tumorais (CTT), que possuem a capacidade de auto-propagação, de se diferenciar em outras células e o mais importante, de iniciar o tumor *in vivo* e *in vitro* (VISVADER e LINDEMAN 2008; SENGUPTA e CANCELAS 2010).

Por muitos anos, tem sido evidente que células-tronco estão envolvidas em processos diversos como cicatrização, metaplasias e câncer. Mas a idéia que o câncer pode conter CTT apenas ganhou aceitação com os experimentos de HAMBURGER e SALMON (1977), que demonstraram que poucas células tumorais foram capazes de formar colônias *in vitro*, produzindo todos os tipos de células dentro de um tumor e estabelecer linhagens de células imortais. Isto aumentou a possibilidade que apenas uma minoria de células auto propagadas dentro do tumor é capaz de sustentá-lo. Esse experimento corrobora com a observação de MAKINO (1959), de que o tumor poderia surgir de células raras com capacidade de auto-propagação.

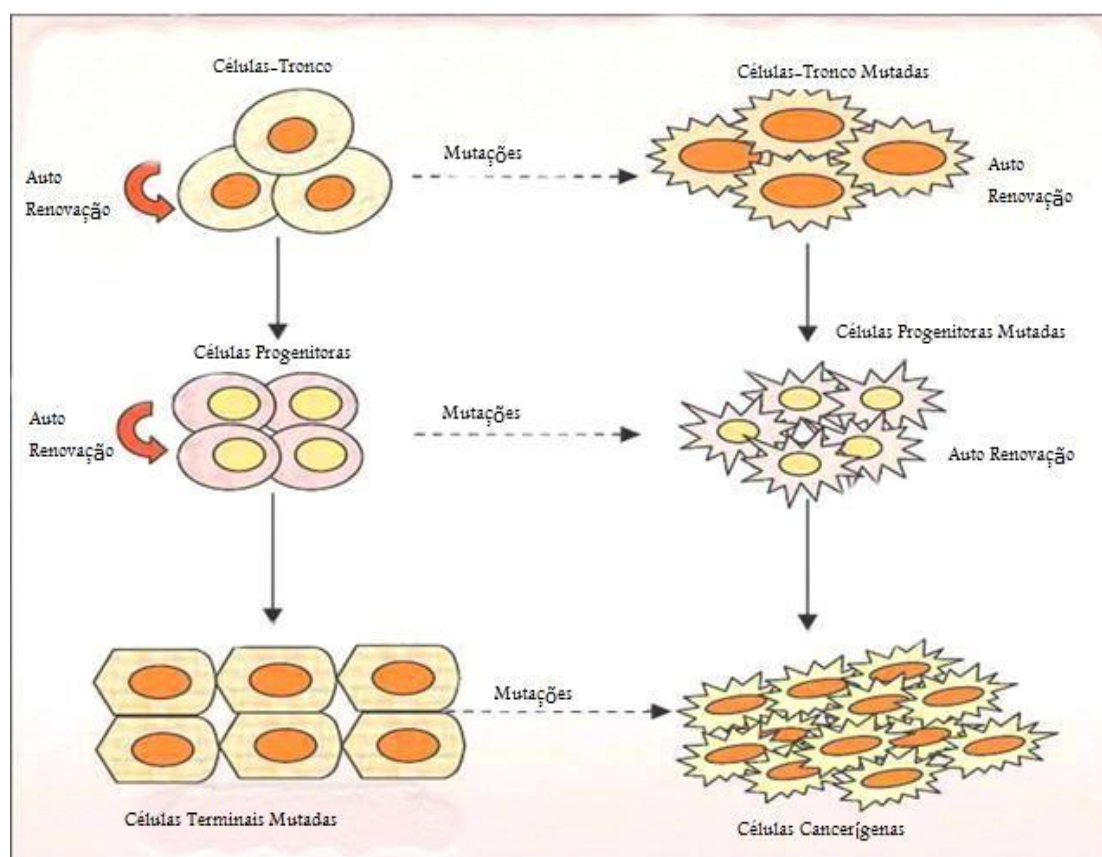
Tem sido proposto que as CTTs originam-se de transformação maligna de células-tronco normais adultas ou de células progenitoras que adquiriram as propriedades de células-tronco. As células-tronco adultas normais, durante a vida, com a sua característica de auto-propagação infinita estão mais suscetíveis ao acúmulo de mutações oncogênicas do que as células diferenciadas que apresentam curta sobrevivência. Outra hipótese é que células diferenciadas (progenitoras) readquirem características de células-tronco por reativação de vias de sinalização como, Wnt/ β catenina, Hedgehog/Ptched, Bmi1, o que facilitaria a auto propagação e a transformação maligna (GAO 2008; McDONALD et al. 2009; WELTE et al. 2010).

As CTTs são um subtipo de células tumorais que assim como as células-tronco normais, possuem habilidade de auto-renovação (por divisão simétrica e assimétrica) e de geração de células diversas que compõem o tumor. CTTs têm sido encontradas em diversos tipos de câncer. Foram identificadas inicialmente em leucemia mieloide aguda (LAPIDOT et al. 1994) e sua presença tem sido relatada em muitos tumores sólidos, incluindo: ovário, mama, cérebro, próstata, pâncreas, fígado, cabeça e pescoço e tumores hematológicos (PONNUSAMY e BATRA 2008; VISVADER e LINDEMAN 2008).

Três observações clássicas definem a existência de CTT: a) somente uma minoria de células dentro de cada tumor tem potencial tumorigênico quando transplantadas em camundongos imunodeficientes; b) células cancerosas tumorigênicas são caracterizadas pelo perfil distinto de expressão de marcadores de superfície e podem ser isoladas das células não-tumorigênicas por procedimentos de imuno-seleção; c) tumores que crescem a partir de células tumorigênicas contêm

populações mistas de células cancerosas tumorigênicas e não-tumorigênicas, recriando a heterogeneidade do tumor de origem (DALERBA et al. 2007).

As CTTs são clinicamente importantes por serem mais resistentes a radioterapia e quimioterapia do que as outras células do tumor. Esta resistência tem sido atribuída ao aumento do reparo de DNA, bem como sua capacidade de expulsar a droga e pelas proteínas anti-apoptóticas (GILBERT e ROSS 2009).



Fonte: Modificada de PONNUSAMY e BATRA (2008)

Figura 1 - Origem das células-tronco tumorais

1.3 MARCADORES MOLÉCULARES PARA CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Os marcadores de superfície das células-tronco normais fornecem um guia para identificar CTTs, baseando-se na premissa de que CTTs são derivadas de células-tronco normais ou na dediferenciação das células progenitoras com similar imunofenótipo. Vários marcadores de superfície celular como CD24, CD44, CD133, c-Kit e moléculas de adesão epitelial (EpCAM), fatores de transcrição Oct-3/4, AP-2 γ e Nanog, entre outros como CD166, CD31, Nestina, CD34, CD38, ALDH1, Bmi1 são utilizados para identificar CTTs (HILL e PERRIS 2007).

A identificação de marcadores por meio da imunistoquímica tem ajudado a identificar CTTs em muitos órgãos. As CTTs foram identificadas em leucemia mielóide contendo antígeno de superfície celular CD34⁺CD38⁻ e com capacidade de reproduzir tumor em animais transplantados (BONNET e DICK 1997). Similar ao sistema hematopoiético foram identificados marcadores de superfície em tumores sólidos. O câncer de mama foi o primeiro tumor sólido no qual se identificou e isolou CTTs, que foram descritas como células com CD44⁺CD24^{-/low} e com capacidade para iniciar o tumor (AL-HAJJ et al. 2003). Posteriormente, foi demonstrado que CD133 marcava CTTs em diferentes tipos tumorais incluindo glioblastoma, meduloblastoma e ependinoma (SINGH et al. 2004; TAYLOR et al. 2005). Em adição, a expressão de CD133 foi observada em CTTs presentes em carcinoma colorretal e de pâncreas (O'BRIEN et al. 2007; HERMANN et al. 2007).

Tem sido descrito que o fenótipo de CTT pode não ser necessariamente igual entre subtipos de câncer e até mesmo em subtipos do mesmo tumor. Em leucemias,

as CTT são isoladas por meio da seleção do marcador de superfície $CD34^{+}$ e $CD38^{-}$, em tumores sólidos, incluindo os de mama, as CTT são selecionadas com marcações $CD24^{-/low}$; $CD44^{+}$ em cérebro, $CD133^{+}$ em cólon, $CD133^{+}$ ou $CD44^{+}$ em próstata, (revisado em RAJAN e SRINIVASAN 2008).

CD133 é uma glicoproteína transmembrânica, também conhecida como prominina-1, originalmente descrita como marcador de célula-tronco hematopoiética. Posteriormente, sua expressão foi observada em células progenitoras, incluindo as do epitélio, onde são encontradas na superfície apical das células (CORBEIL et al. 2010).

O gene CD133 codifica dois *splices* variantes: Prom-1.s1 e Prom-1.s2 e as proteínas resultantes são reconhecidas por três anticorpos dirigidos contra epítomos diferentes (YU et al. 2002). Apesar do pouco conhecimento sobre as funções biológicas destas duas variantes de CD133, tem sido especulado que possam exercer algum papel na interação célula-célula e que possam estar diferentemente envolvidas no desenvolvimento fetal e na homeostase de órgãos maduros (YU et al. 2002).

A Nestina é um filamento intermediário de proteína do citoesqueleto, que foi identificado pela primeira vez em células-tronco neuroepiteliais. É amplamente expressa durante embriogênese de mamíferos. Sua expressão é abundante durante fases iniciais da neurogênese do sistema nervoso central e periférico, sugerindo que células nestina-positivas sejam cruciais para o desenvolvimento embrionário neural. Apesar desta predominância no sistema neural, nestina também está presente em outros tecidos como retina, derme, pâncreas, trato gastrointestinal, alguns tecidos adultos normais, alguns tecidos adultos lesionados ou em tumores malignos (WIESE et al. 2004). Em tecido diferenciado Nestina é pouco expressa, mas pode ser super-

expressa em tecidos adultos sob certas condições patológicas, como em injúrias no SNC e no tecido muscular, e em tumores neuroepiteliais, o que pode demonstrar remodelação ou reversão de um fenótipo imaturo. Assim, a sua expressão pode indicar população de CTT (WIESE et al. 2004; FUSI et al. 2010). Em melanoma, Nestina tem sido considerada marcador adicional para identificar CTTs (FUSI et al. 2010).

A família de fatores de transcrição AP-2 é constituída por 5 membros: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ e AP-2 ϵ . Localiza-se predominantemente no núcleo, onde se liga a seqüências alvo e regula a transcrição de determinados genes (ECKERT et al. 2005). Alguns dos genes ativados por AP-2 é o TGF- α , o receptor de estrógeno, c-KIT, collagenase tipo IV e HER2/neu. AP-2 também regula negativamente alguns genes, dentre eles o MCAM/MUC18, c-EBP- α durante a adipogênese e c-MYC (HILGER-EVERSHEIM et al. 2000). Os membros desta família são requeridos para o crescimento normal e morfogêneses durante o desenvolvimento dos mamíferos. A proteína AP-2 δ tem sua expressão restrita ao coração, SNC e retina, todos em estado de desenvolvimento. Porém, os fatores de transcrição AP-2 não estão implicados apenas no desenvolvimento normal, mas parecem também estar envolvidos na neoplasia celular. Níveis aumentados de AP-2 têm sido encontrados em vários tipos de tumores (ECKERT et al. 2005).

A proteína AP-2 γ é codificada pelo gene TFAP2C localizado no cromossomo 20q13.2 em humanos. AP-2 γ é essencial para o início do desenvolvimento embrionário, para implantação placentária e está envolvida na auto-proliferação e sobrevivência das células germinativas (AUMAN et al. 2002). A relação entre AP-2 γ e cânceres humanos foi documentada em câncer de mama foi demonstrado aumento

do número de cópias do locus de AP-2 γ no cromossomo 20q13.2, tanto em tumores primários como em linhagens celulares (TANNER et al. 1994). Alta expressão da proteína AP-2 γ também foi observada em câncer de mama e de testículo quando comparada com tumor benigno dos órgãos respectivos (TURNER et al. 1998; HOEIHANSEN et al. 2004).

A proteína CD44 é um receptor da superfície celular que é provavelmente um dos mais bem estabelecidos e comuns marcadores de CTTs. CD44 é uma glicoproteína transmembrânica, receptor do ácido hialurônico. Apresenta a função de adesão celular, transmissão de sinais mediando hematopoiese e apoptose. CD44 tem sido associado ao câncer clinicamente agressivo. Pode ser encontrado em células linfo-hematopoiéticas, tecidos epiteliais e não epiteliais. Entre os tumores que expressam esta proteína temos: carcinoma papilífero de tireóide, carcinomas de mama, gastrointestinal, bexiga, ovário, colo de útero, próstata, melanoma e linfomas não Hodgkin (RHIJIN et al. 2003).

A proteína CD44 tem sido identificado sozinho ou combinado com outro marcador em CTTs em vários tipos de câncer, como cabeça e pescoço (CD44⁺), cólon (CD44⁺/antígeno epitelial específico -ESA⁺), pâncreas (CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺) (SENGUPTA e CANCELAS 2010) e câncer de mama (CD44⁺/CD24^{-low}) (AL-HAJJ et al. 2003; HWANG-VERSLUES et al. 2009). Alguns trabalhos afirmam que a inibição da expressão de CD44 tem impedido a formação de nódulos tumorais metastáticos em camundongos transfectados com células de carcinoma hepatocelular CD90⁺CD44⁺ no pulmão, sugerindo uma dependência de CTT CD44⁺ no crescimento tumoral (YANG et al. 2008). Estudo realizado por ZHU et al. (2010) demonstrou que o fenótipo de CTTs em hepatocarcinoma pode ser definido por

CD133⁺CD44⁺ na superfície da célula. As células do hepatocarcinoma mostraram propriedade de CTTs, incluindo auto-propagação e diferenciação, e o transplante em camundongos revelou alta capacidade tumorigênica em células CD133⁺CD44⁺.

O proto-oncogene c-KIT codifica uma proteína transmembrânica, o receptor tipo III de tirosina quinase, que tem estrutura semelhante ao receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) e ao do receptor do fator estimulador de colônia tipo I (CSF1-R). A proteína c-Kit tem papel no desenvolvimento de muitos processos embrionários, incluindo gametogêneses, melanogênese e hematopoiese, bem como algumas função de transdução de sinal em muitas células (MIETTINEN e LASOTTA 2005). Normalmente, a proteína Kit é ativada por fosforilação, levando a uma cascata de ativação de vários fatores de transcrição, como de genes que controlam a apoptose, diferenciação celular, proliferação, quimiotaxia e adesão celular. Vários tipos de células são dependentes da ativação de c-Kit, como mastócitos, células-tronco hematopoéticas, células germinativas, melanócitos, células de cajal do trato gastrointestinal (MIETTINEN e LASOTTA 2005).

A expressão de c-Kit foi observada em tumores germinativos de testículo, carcinomas epiteliais e tumores germinativos de ovário, leucemia mielóide aguda e tumor estromal gastrointestinal (HEINRICH et al. 2002). ERDOGAN et al. (2007), relataram que a proteína c-Kit foi superexpressa em tumores mesenquimais de útero e ovário, sugerindo que c-Kit tem um significativo papel na oncogeneses desse tumores.

1.4 CÉLULAS- TRONCO TUMORAIS E TUMOR DE OVÁRIO

Tem sido sugerido que as células-tronco normais adultas contribuem para o reparo e regeneração do epitélio normal do ovário após a ruptura do tecido causado pela ovulação. Dentro do epitélio ovariano, as células- tronco se dividem de maneira assimétrica para manter a homeostase tecidual. Como já foi dito, repetidas auto-propagações podem acumular mutações podendo levar a transformações malignas das células-tronco, levando ao surgimento das CTTs (HOMBACH-KLONISCH et al. 2008). Processos inflamatórios e oxigênio reativo gerado durante a ovulação e cicatrização ovulatória podem ser fatores importantes que contribuem para a carcinogênese da superfície do epitélio ovariano, levando a quebras na fita do DNA e mutações causadas por danos oxidativos (NESS e COTTREAU 1999).

Como citado anteriormente, neoplasia epitelial de ovário é considerada como a malignidade ginecológica mais letal, com a maioria dos casos sendo diagnosticados após metastatização da doença. Apesar da responsividade à terapia primária, a maioria das pacientes apresenta doença recorrente devido à seleção ou aquisição de quimio-resistência por células residuais (VISVADER e LINDEMAN 2008).

A resistência à quimioterapia é um dos fatores que suportam a existência de CTT em câncer de ovário. Nos últimos anos vem sendo demonstrado que uma pequena população de células tumorais (menos do que 5%), as CTTs, são responsáveis pela agressividade da doença, metástase e resistência à terapia (PONNUSAMY e BATRA 2008). Estas células são isoladas, geralmente, usando-se marcadores específicos para células-tronco normais do mesmo órgão (VISVADER e LINDEMAN 2008). Outro fator que comprova a existência de CTTs em tumores de

ovário é a diversidade fenotípica histológica deste câncer. Pode ser que essa diversidade se deva à aquisição de plasticidade celular. Com isso, é possível sugerir que CTTs existem e contribuem para o câncer de ovário (CHIEN et al. 2007; TILLY e RUEDA 2008).

A possível multipotencialidade dos clones em tumor de ovário foi relatada pela expressão de três marcadores de célula-tronco tumoral: Oct4, Nanog e Nestina em trabalho feito por BAPAT et al. (2005). Neste trabalho foram estudados 65 clones celulares provenientes de uma cultura de células derivadas de ascite de uma paciente com câncer de ovário maligno estágio IV (adenocarcinoma seroso). Foi observado que 19 clones imortalizaram espontaneamente. Todos estes clones co-expressavam citoqueratina e vimentina, E-caderina e CD44. Este padrão de expressão indicava a natureza mesotelial destas células, o que está de acordo com o entendimento de que carcinoma de ovário epitelial resulta da transformação do mesotélio primitivo. Dois clones imortalizados foram analisados para a expressão de marcadores específicos associados com CTT e/ou com células progenitoras, incluindo Nestina (marcador de células progenitoras), Oct 3/4 e Nanog (essenciais para a manutenção do estado indiferenciado). Os três marcadores foram encontrados em culturas celulares dos dois clones, indicando sua natureza multipotencial. Esses 2 clones foram capazes de formar tumores em camundongos *nude* (sem imunidade), com características histopatológicas similares ao tumor de origem.

Mais recentemente, FERRANDINA et al. (2008) estudaram 41 pacientes com câncer de ovário, e observaram por imunoistoquímica, que células de câncer de ovário primário expressavam mais CD133-1 e CD133-2 do que células de ovários normais e do que tumor benigno. Além disso, a maioria das células CD133⁺ reagiu

com anticorpo monoclonal anti-citoqueratina-7, confirmando a origem epitelial destas células. Quando colocadas em cultura, células CD133⁺ exibiram maior eficiência clonogênica e maior potencial proliferativo do que células CD133⁻. Foi observado também que a porcentagem de células expressando CD133 diminuiu ao longo do tempo de cultura, enquanto seu número absoluto aumentou, denotando sua capacidade de auto-renovação. Houve também uma correlação direta entre a porcentagem de células CD133-1⁺ e CD133-2⁺, sugerindo que as duas isoformas podem ser usadas indiferentemente para selecionar e marcar células ovarianas com capacidade de célula-tronco.

BABA et al. (2009) analisaram 42 linhagens de câncer de ovário e observaram que 15 linhagens foram positivas para expressão de CD133. Partindo do princípio que CTTs, incluindo as que são CD133⁺, podem apresentar resistência inerente a agentes quimioterápicos e sabendo que derivados da platina são geralmente usados como quimioterapia de primeira linha no tratamento de câncer de ovário, estes autores observaram que nas 42 linhagens tratadas aleatoriamente, células CD133⁺ foram mais resistentes à cisplatina do que as CD133⁻.

Existem poucos trabalhos relatando o envolvimento da proteína AP- 2 γ em câncer de ovário. ØDEGAARD et al. (2006), relataram aumento da expressão nuclear de AP-2 γ em carcinomas de ovário malignos quando comparados com lesões benignas e *borderlines*.

Outros estudos também mostraram que células com CD44⁺ originadas de ascite de câncer de ovário estágio avançado (III/IV) mantiveram o fenótipo maligno *in vitro* por mais de 20 passagens, sugerindo que essas células apresentam capacidade de auto-proliferação. Além disso, essas células foram capazes de formar

tumores em camundongos *nude*, determinando o seu potencial tumorigênico (ALVERO et al. 2009).

Muitos estudos têm investigado a expressão da proteína c-Kit no epitélio de ovário maligno. Estes estudos têm incluído tipos histológicos heterogêneos e os resultados têm sido divergentes. KHALIFEH et al. (2005), observaram que 21% dos carcinomas serosos malignos de ovário eram positivos para c-Kit. Outros estudos observaram que a proteína c-Kit foi expressa em 71% dos carcinomas serosos de ovário (TONARY et al. 2000), em 87% dos casos de disgerminomas de ovários (SEVER et al. 2005) e em 52% dos casos de carcinoma seroso em estadio avançado (RASPOLINI et al. 2004).

Enquanto a etiologia do câncer ainda permanece a ser elucidada, muitas teorias sobre a tumorigênese têm sido propostas. Considerando que as neoplasias epiteliais de ovário apresentam heterogeneidade de fenótipos histológicos, de graus, de diferenciação, de níveis de recorrência e de metástase, a identificação de CTTs poderia contribuir para o conhecimento do seu papel na carcinogênese. Se confirmada a presença de CTTs em tumores de ovário, poderemos tentar desenvolver novas terapias, dirigidas a essas células, como forma de melhorar o resultado do tratamento do câncer ovariano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de marcadores de células-tronco tumorais (CD133, CD44, c-KIT, Nestina e AP-2 γ) em tumores epiteliais benignos, *borderlines* e malignos de ovário.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO:

Analisar a expressão das proteínas CD133, CD44, c-KIT, Nestina e AP-2 γ em tumores epiteliais benignos, *borderlines* e malignos de ovário, por meio da técnica de imunoistoquímica.

Correlacionar a expressão das proteínas (CD133, CD44, c-KIT, Nestina e AP-2 γ) com parâmetros clínico-patológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE TECIDOS E CARACTERIZAÇÃO DAS PACIENTES

Foram selecionadas 99 amostras de neoplasia do epitélio de ovário fixadas em formalina e embebidas em parafina, obtidas do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo-São Paulo. Todas as pacientes foram operadas e tratadas neste mesmo hospital, entre os anos de 2000 e 2009. As amostras foram colhidas previamente a qualquer procedimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo pelo número 1255/09.

Novos cortes histológicos foram obtidos de cada bloco para a classificação e coleta dos dados morfológicos. Todos os casos foram re-classificados de acordo com o esquema proposto pela AJCC tanto para o tipo tumoral quanto o grau histológico por um patologista experiente (Dr. Gilles Landman). Os prontuários das pacientes foram analisados para a obtenção dos dados clínicos.

Para as análises de imunoistoquímica foram montados dois *Tissue Microarray* (TMA), um contendo 47 casos unilaterais e 7 casos indeterminados e outro contendo 45 casos bilaterais.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes atendidas e tratadas no Hospital A.C. Camargo.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Insuficiência de material no bloco de parafina.

Ausência de dados suficientes no prontuário médico.

3.4 CONSTRUÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Para realização das análises imunoistoquímicas foram construídos dois *Tissue Microarrays* (TMA).

A organização dos blocos de TMA seguiu os passos tradicionalmente descritos na literatura. Brevemente, a partir do corte do bloco de parafina original corado por H&E (hematoxilina e eosina), as áreas de tumor viável foram selecionadas e marcadas com caneta. Estas áreas tinham equivalência no bloco de parafina original, identificado como bloco doador. A partir deste ponto, as áreas selecionadas foram transferidas para o bloco receptor através do uso do *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, MD, USA). Assim, foi confeccionado o bloco de TMA com cilindros de 1,0 mm (Figura 2). Em cada caso foram selecionadas duas regiões (chamadas de *core*) para serem montadas no TMA.

A partir destes blocos foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro, previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ USA) (Figura 2), em duplicatas. Os blocos foram cortados por meio de micrótomo mecânico na espessura de 4µm, As lâminas contendo os cortes histológicos foram banhadas em parafina para evitar a oxidação e guardadas a -20°C.

Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por hematoxilina e eosina (H&E) em vários níveis de profundidade do bloco de TMA.

Em seguida, as lâminas obtidas foram submetidas à técnica de imunistoquímica para cada marcador. A técnica utilizada seguiu os passos tradicionais e rotineiros do laboratório. Para cada marcador, foi usada a melhor técnica testada e estabelecida de diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno. Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado e de um controle negativo da reação (retirada do anticorpo primário e retirada do complexo secundário).

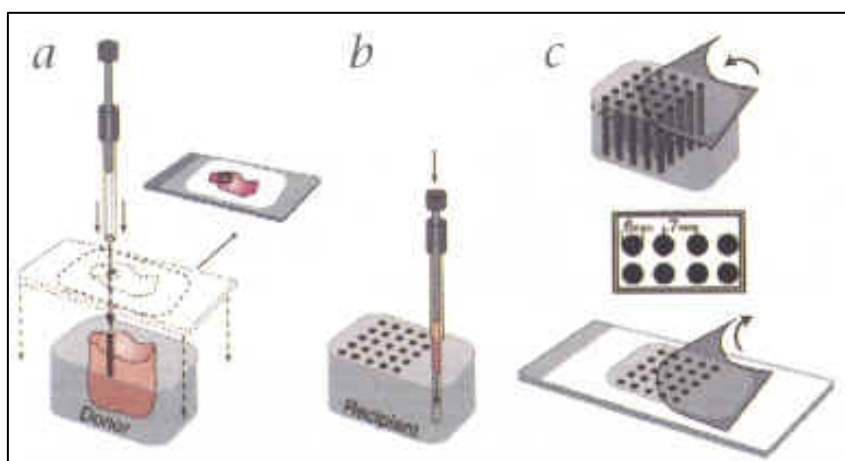


Figura 2 - Representação esquemática da montagem do TMA

3.5 IMUNOISTOQUÍMICA (IHC)

Para avaliar a expressão das proteínas CD44, c-KIT, CD133, Nestina e AP-2 γ , cortes histológicos de 4 μ m foram obtidos do bloco de TMA. Os cortes foram

desparafinizados em estufa a 60 °C por 6 horas e em xilol, 3 banhos de 5 min cada e re-hidratados em álcool (100%, 95%, 70%) e posteriormente água corrente por 5 min. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) ou EDTA+TRIS (pH 9,0) e aquecidos em panela de pressão por 15 min. A Tabela 1 apresenta os tipos de recuperação antigênica e as soluções utilizadas. Depois da recuperação antigênica as lâminas histológicas foram resfriadas por 15 min em temperatura ambiente e lavadas com água corrente por 5 min.

As lâminas foram colocadas em peróxido de hidrogênio 3% (10V) 3 vezes por 5 min cada, para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água corrente por 5 min. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com caseína (Protein Block Serum-Free- DakoCytomation, Carpinteria, USA) por 20 min à temperatura ambiente em câmara úmida.

Os anticorpos primários foram diluídos em diluente contendo 0,05 mol/L de tampão Tris-HCl e 0,1% de Tween 20 (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*, DakoCytomation, Carpinteria, USA) e as lâminas foram então incubadas a 4 °C, *overnight* (12 a 14 horas) em câmara úmida. A diluição dos anticorpos está representada na Tabela 1. Após 3 lavagens com tampão PBS 1X por 5 minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, contendo *pool* de anticorpos anti-camundongo, anti-coelho ou anti-cabra , utilizando-se o *Kit AdvanceTM HRP* (DakoCytomation, Carpinteria, USA), ou o *kit LSAB+ System – HRP* (DakoCytomation, K0690, Carpinteria, CA, EUA), conforme as necessidades do anticorpo primário (Tabela 1), por 1 hora em câmara escura, e lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos cada. A coloração foi realizada utilizando-se 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (DakoCytomation, Carpinteria, USA). Os espécimes

foram contra-corados com hematoxilina, desidratadas com álcool e xilol e montadas com meio permanente e lamínula.

Tabela 1 - Anticorpos, clones, fontes, diluição e tipo recuperação antigênica utilizadas para a técnica de imunistoquímica.

Anticorpo primário	Clone	Fonte	Diluição	Recuperação antigênica	Sistema de detecção
AP2 gama	Policlonal de cabra	R&D	1:50	EDTA-TRIS 1mM, pH 9.0; panela de pressão	LSAB+ System – HRP
CD44	Monoclonal de camundongo-DF1485	Leica Microsystems	1:25	Citrato 10mM pH6.0; panela de pressão	Advance HRP TM
CD133	Policlonal de coelho	Abcam	1:100	Citrato 10mM pH6.0; panela de pressão	Advance HRP TM
c-Kit	Polyclonal de coelho	Dako	1:200	Citrato 10mM pH6.0; panela de pressão	Advance HRP TM
Nestina	Monoclonal de camundongo-10C2	Abcam	1:400	Citrato 10mM pH6.0; panela de pressão	Advance HRP TM

3.6 INTERPRETAÇÕES DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação dos resultados do estudo imunistoquímico foi feita para cada anticorpo utilizando o Sistema Automatizado de Imagem Celular (ACIS III, DAKO, Carpinteria, CA, EUA).

De maneira resumida, os componentes do ACIS III consistem de um microscópio digital automatizado e de um computador com um programa de captura

de imagem e um sistema de processamento de imagens. Cada lâmina corada por imunohistoquímica foi digitalizada e as imagens capturadas foram revisadas pelo patologista na tela do computador. O ACIS III é capaz de detectar, contabilizar e classificar os tipos celulares baseados nos níveis de matiz, saturação e luminosidade. O sinal é então convertido para mensuração de densidade numérica. Para analisar a expressão das proteínas foi utilizado o programa computacional *membrana e cytoplasm e nuclei*, residente no sistema. Este programa mede a intensidade da coloração do citoplasma e da membrana e fornece um resultado em variáveis contínuas que vão de 0 a 256. Para isso é atribuído o *threshold*, ou seja, indica-se para o software as células com imuno-reatividade e as células sem imuno reatividade

As áreas a serem analisadas de cada lâmina foram selecionadas manualmente, utilizando-se ferramentas de seleção do ACIS III. Para as análises estatísticas foram utilizadas as médias de duas regiões de cada caso, pois o bloco de TMA foi construído em duplicata.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas (faixa etária, faixa de expressão dos marcadores moleculares, tipo patológico, lados, local estadiamento, invasão e linfonodos) e as medidas de tendência central (media e mediana) e de variabilidade (mínimos, máximos e desvio padrão (dp) para descrever as variáveis numéricas (idade e as medidas de expressão).

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a associação entre a expressão dos marcadores e as variáveis clínico-patológicas com duas categorias e o teste de Kruskal-Wallis para com três categorias.

O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar a correlação entre os marcadores, em tabelas 2X2 onde pelo menos uma frequência foi menor do que 5, o teste exato de Fisher foi adotado.

O tempo de seguimento foi calculado da data do início do tratamento até o óbito ou até a última informação e até a data de ocorrência de recidiva para o período livre de doença.

Pontos de corte foram criados a fim de utilização nos testes estatísticos e de sobrevida. Para idade, c-kit, Nestina e AP-2 γ a mediana foi considerada e o segundo tercil para CD44 e CD133.

A técnica de Kaplan-Meier foi aplicada para estimar a probabilidade de sobrevida e o teste de log-rank para comparar as curvas de sobrevida. O nível de significância de 5% foi cotado em todos os testes estatísticos. O modelo de regressão de COX foi utilizado para estimar os riscos relativos para morte e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Para cálculo de todas as análises estatísticas foi utilizado o programa de computador estatístico STATA versão 7.0. (StataCorp. 2001. Stata Statistical Software. Release 7.0. College Station, TX: Stata Corporation)

4 RESULTADOS

Neste estudo foram analisadas a expressão das proteínas relacionadas à CTTs (CD44, CD133, c-Kit, Ap-2 γ e Nestina) em 99 casos de neoplasia epitelial de ovário por meio de imunoistoquímica. A Tabela 2 mostra as características demográficas e os parâmetros clínico-patológicos das pacientes.

Entre as 99 amostras de neoplasia epitelial de ovário, 47 casos (47,5%) eram unilaterais e 45 casos (45,5%) eram bilaterais, o tumor comprometia os dois ovários. Não foi possível obter informações em 7 casos (7%). A grande maioria dos tumores bilaterais era composta do mesmo subtipo histológico, entretanto em 6 casos eram de subtipos diferentes, mas o mesmo tipo histológico (benigno/benigno; *borderline/borderline* ou maligno/maligno) e em um caso era de sub-tipo diferente e de tipo histológico também diferente (benigno/*borderline*). A idade das pacientes variou de 16 a 89 anos, com mediana de 53 anos.

Tabela 2 - Características demográficas e clínico-patológicas das pacientes portadoras de tumores epiteliais de ovário.

Parâmetros Clínicos e Patológicos	Total (%)
<u>Tipo patológico</u>	
Benigno	18 (18)
Borderline	9 (8)
Maligno	72 (74)
<u>Lateralidade</u>	
Unilateral	47(47,5)
Bilateral	45 (45,5)
Indeterminado	7 (7)
<u>Grau Histológico</u>	
Bem/Moderadamente diferenciado	47 (70)
Pouco diferenciado	20 (30)
Não avaliados	32
<u>Metástase à distância</u>	
Sim	46 (46,5)
Não	53 (53,5)
<u>Extravasamento de Cápsula Linfonodal</u>	
Sem invasão	22 (34)
Com invasão	43 (66)
Não avaliados	34
<u>Estádio clínico agrupado</u>	
I + II	16 (22,5)
III + IV	55 (77,5)
Não avaliados	28

4.1 ASSOCIAÇÕES ENTRE EXPRESSÃO DOS MARCADORES E PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

A análise de associação entre a expressão dos marcadores e os parâmetros clínico-patológicos foi realizada por meio dos valores contínuos, obtidos pelo ACIS, sem categorizar; neste caso foi aplicado o teste de Mann Whitney ou Kruskal-Wallis. A associação entre a variável graduação histológica e os marcadores foi realizada com os tumores malignos e associação entre estágio clínico foi realizada com os tumores *borderline* e malignos, as associações entre as outras variáveis foram realizadas com todos os tumores estudados, benigno, *borderline* e maligno. Entre os 99 casos estudados alguns deles não puderam ser analisados por imunoistoquímica, pois houve descolamento do material na lâmina ou por não ter representação tumoral, desse modo para cada marcador houve uma perda de casos avaliados. A Tabela 3 mostra as medidas de tendência central e de variabilidade da expressão de cada marcador.

Em relação a associação entre as variáveis clínico patológicas e os marcadores

Neste estudo foi observado que o marcador de células-tronco, CD133, apresentou expressão positiva forte ou moderada em todos os tumores analisados, benignos, *borderline* e malignos. As Figuras 3, 4 e 5 mostram imagens representativas da reação de imunoistoquímica. Dos 99 casos estudados 11 não puderam ser analisados por imunoistoquímica para o anticorpo Nestina, pois houve descolamento do material na lâmina ou por não ter representação tumoral.

Não foi encontrada qualquer associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de CD133. A Tabela 4 mostra os resultados das análises.

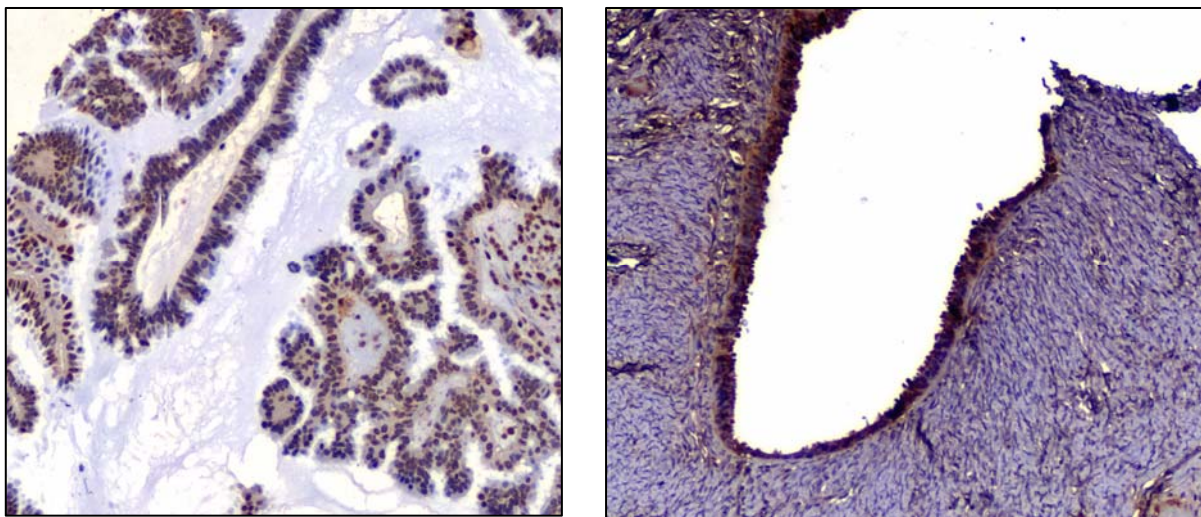


Figura 3 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica, mostrando expressão positiva da proteína CD133 em tumores epiteliais benignos de ovário.

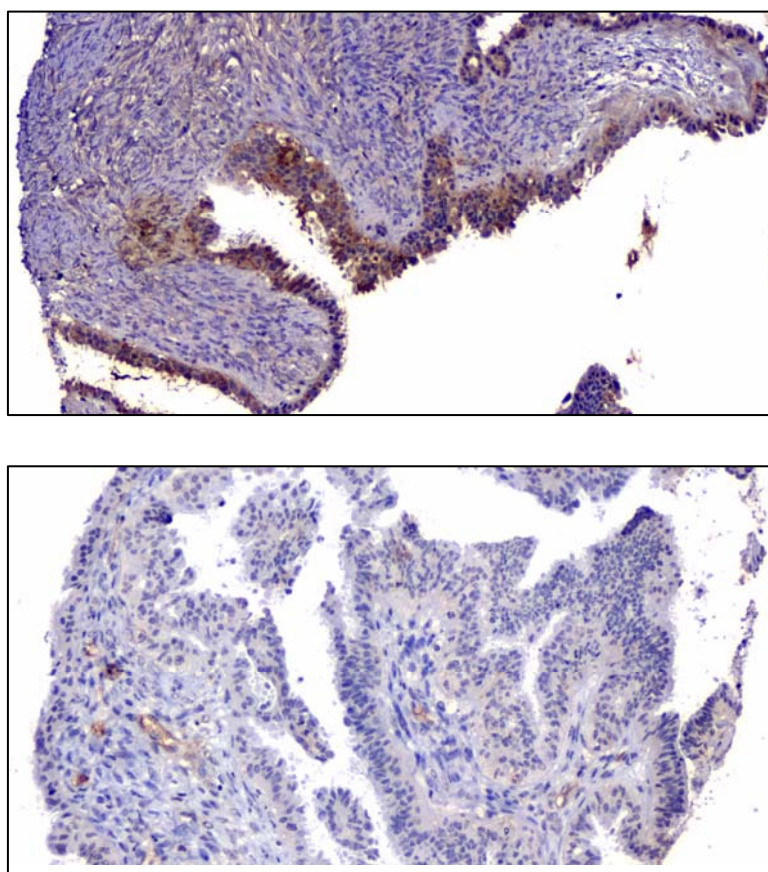


Figura 4 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica, mostrando expressão positiva da proteína CD133 em tumores epiteliais *borderline* de ovário, marcação de membrana e citoplasma. Aumento de 200X.

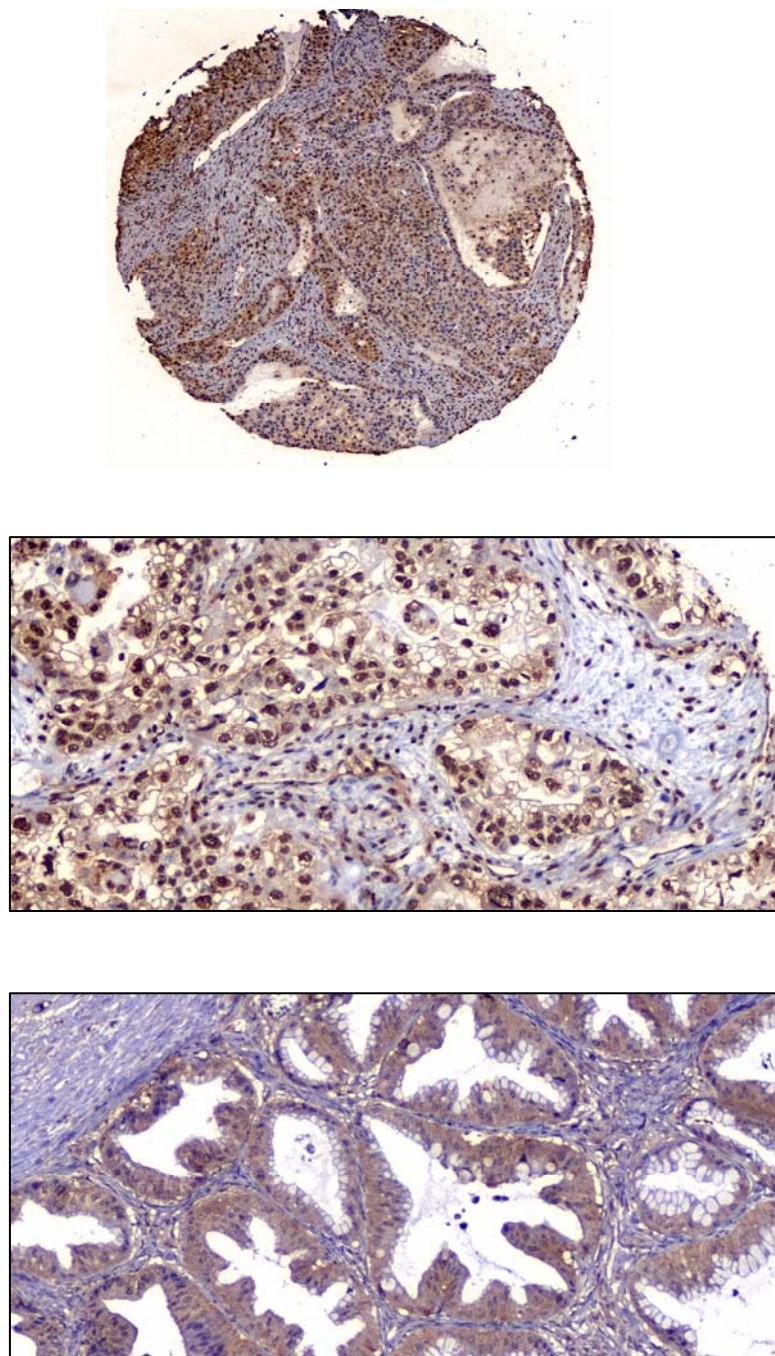


Figura 5 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica, mostrando expressão positiva da proteína CD133 em tumores epiteliais malignos de ovário. Aumento de 100X e 200X.

Tabela 3 - Medidas de tendência central e de variabilidade da expressão de cada marcador.

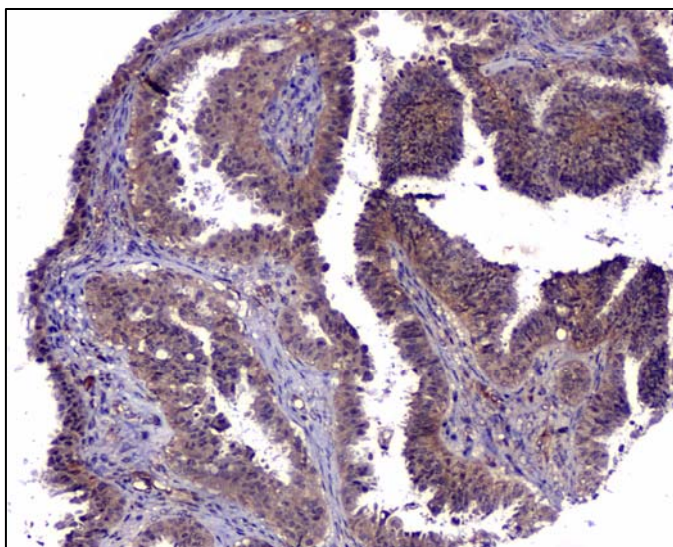
Marcador	Medidas	Resultado
Nestina	N	88
	Variação	0,0 – 117,6
	Mediana	39,9
	Média	46,0
	Desvio Padrão	34,9
c-Kit	N	80
	Variação	0,0 – 97,8
	Mediana	47,3
	Média	47,1
	Desvio Padrão	26,7
CD44	N	82
	Variação	0,8 – 150,7
	Mediana	36,3
	Média	47,9
	Desvio Padrão	39,4
AP-2 γ	N	85
	Variação	0,0 – 100,0
	Mediana	65,4
	Média	62,7
	Desvio Padrão	35,1
CD133	N	84
	Variação	1,3 – 144,0
	Mediana	83,8
	Média	79,4
	Desvio Padrão	35,4

Tabela 4 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão CD133.

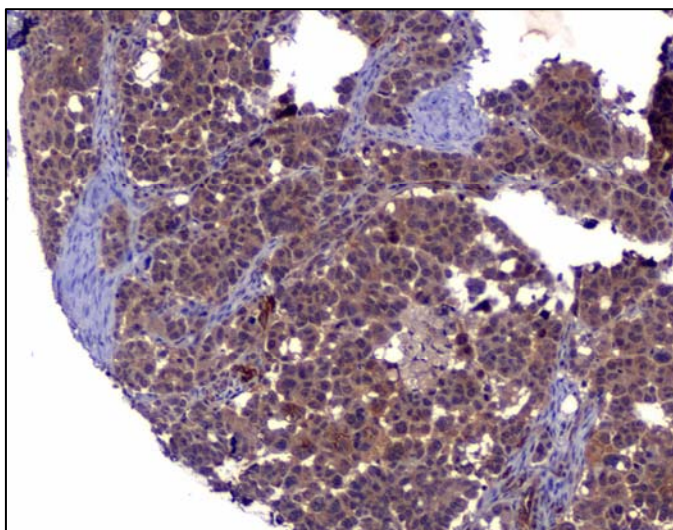
Variável	Categoria	N	Variação	Mediana	Média (dp)	p-valor
Faixa etária (anos)	≤ 53	38	1,3 – 144,0	84,3	77,0 (39,0)	0,5611
	> 53	44	2,0 – 137,7	81,6	82,3 (32,6)	
Tipo patológico	Benigno	14	37,2 – 144,0	96,8	95,9 (27,0)	0,1069*
	Borderline	4	12,8 – 113,2	84,8	73,9 (44,5)	
	Maligno	64	1,3 – 143,7	77,4	75,6 (36,1)	
Lados	Bilateral	41	1,3 – 143,7	68,0	73,6 (43,0)	0,1778
	Unilateral	36	37,2 – 144,0	87,3	86,4 (24,6)	
Cápsula	Sem invasão	13	12,8 – 127,6	84,1	75,9 (36,4)	0,6493
	Com invasão	40	1,3 – 143,7	66,7	73,1 (37,1)	
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	41	1,3 – 127,8	68,0	68,4 (31,8)	0,0782
	Pouco	18	2,0 – 143,7	87,9	87,3 (43,4)	
Estádio FIGO	I + II	14	12,8 – 127,3	77,3	72,2 (33,5)	0,6433
	III + IV	47	1,3 – 143,7	78,4	77,4 (38,5)	
Metástase à distância	Sim	45	1,3 – 143,7	81,0	78,8 (38,9)	0,9785
	Não	39	12,8 – 144,0	85,0	80,1 (31,4)	

p-valor obtido pelo teste Mann-Whitney ou *Kruskal-Wallis

A proteína Nestina foi encontrada expressa em maior quantidade nos tumores malignos ($p=0,0499$). Da mesma forma, foi observada uma alta associação entre metástase tumoral e expressão de Nestina ($p=0,0087$). Tumores que apresentaram metástase à distância tiveram maior expressão de Nestina quando comparados com os tumores sem metástase. Em relação às demais variáveis estudadas, não houve diferença significativa para expressão de Nestina. A Figura 6 mostra imagens representativas das reações de imunoistoquímica com expressão da proteína Nestina. A Tabela 5 mostra os resultados das associações entre a proteína Nestina e as características clínico-patológicas.



A



B

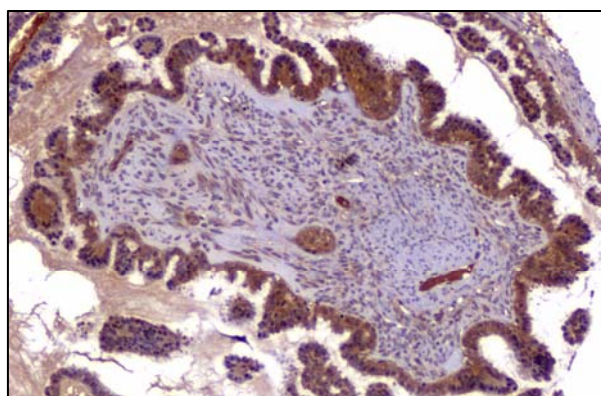
Figura 6 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína Nestina (marcação citoplasma e membrana). A, tumor epitelial *borderline* de ovário; B, tumor epitelial maligno de ovário. Aumento de 200X.

Tabela 5 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão de Nestina.

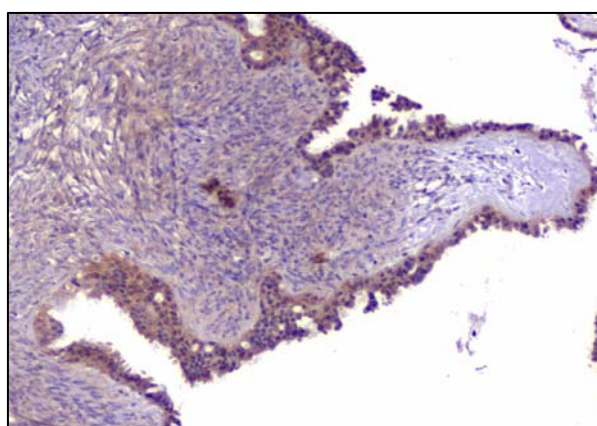
Variável	Categoria	N	Variação	Mediana	Média (dp)	p-valor
Faixa etária (anos)	≤ 53	41	0,0 – 117,6	33,6	45,6 (35,9)	0,8317
	> 53	46	0,0 – 114,2	45,5	47,0 (34,4)	
Tipo patológico	Benigno	18	0,0 – 112,1	19,9	33,4 (38,8)	0,0499*
	Borderline	5	0,0 – 86,5	24,1	30,9 (34,4)	
	Maligno	65	0,2 – 117,6	48,9	50,6 (33,1)	
Lados	Bilateral	41	1,3 – 117,6	40,1	46,8 (32,0)	0,6462
	Unilateral	41	0,0 – 112,1	41,1	45,7 (37,9)	
Cápsula	Sem invasão	15	0,0 – 93,5	28,4	35,6 (29,5)	0,1509
	Com invasão	40	0,2 – 114,2	48,9	50,1 (34,3)	
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	42	0,2 – 117,6	42,6	47,5 (34,9)	0,1067
	Pouco	18	10,4 – 114,2	57,9	60,9 (25,3)	
Estádio FIGO	I + II	14	1,3 – 98,4	48,8	47,0 (28,2)	0,5968
	III + IV	49	0,2 – 117,6	52,8	53,8 (33,6)	
Metástase à distância	Sim	47	0,2 – 117,6	53,2	54,2 (33,4)	0,0087
	Não	41	0,0 – 112,1	28,7	36,5 (34,6)	

p-valor obtido pelo teste Mann-Whitney ou *Kruskal-Wallis

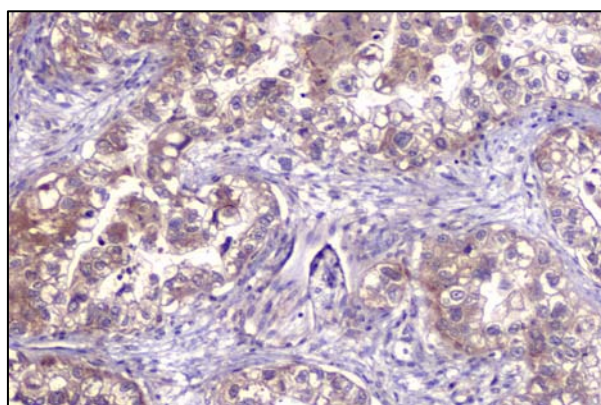
A análise estatística da expressão da proteína c-Kit mostrou associação apenas em relação à capacidade de metastatização, ou seja, tumores com metástase expressaram mais c-Kit do que os não tumores sem metástase ($p = 0,0366$). (Figura 7; Tabela 6).



A



B



C

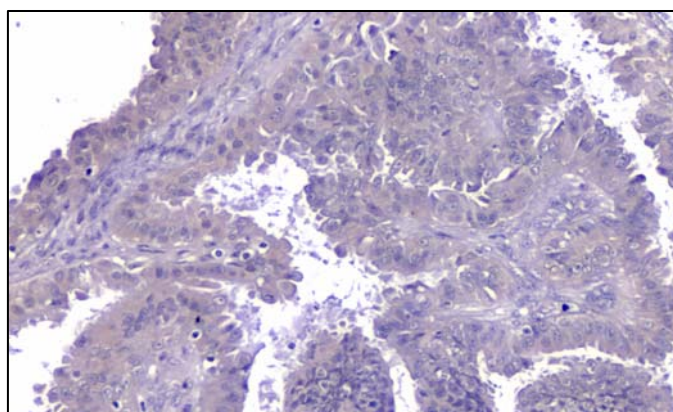
Figura 7 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína c-Kit em tumores epiteliais de ovário, marcação citoplasmática. A, tumor benigno; B, tumor *borderline*; C, tumor maligno. Aumento de 200X.

Tabela 6 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão c-Kit.

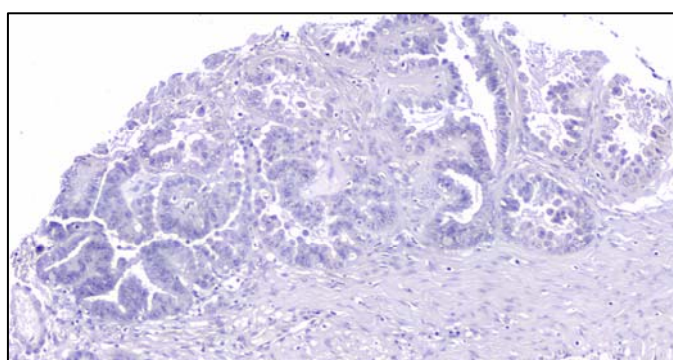
Variável	Categoria	N	Variação	Mediana	Média (dp)	p-valor
Faixa etária (anos)	≤ 53	36	0,0 – 97,8	39,6	42,7 (28,4)	0,2030
	> 53	42	2,4 – 93,8	48,1	49,9 (25,2)	
Tipo patológico	Benigno	14	1,5 – 97,8	30,0	40,5 (35,4)	0,4903*
	Borderline	5	5,2 – 79,9	24,6	40,1 (35,2)	
	Maligno	61	0,0 – 93,8	47,8	49,1 (23,7)	
Lados	Bilateral	39	12,8 – 90,3	47,8	49,5 (19,8)	0,3305
	Unilateral	34	0,0 – 97,8	41,9	43,6 (32,0)	
Cápsula	Sem invasão	15	5,2 – 93,8	53,5	49,0 (30,7)	0,7087
	Com invasão	37	0,0 – 92,1	46,9	46,8 (23,1)	
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	40	0,0 – 93,8	45,8	48,5 (25,5)	0,3456
	Pouco	16	19,2 – 90,3	53,3	54,6 (16,2)	
Estádio FIGO	I + II	14	0,0 – 93,8	42,1	46,3 (28,7)	0,4346
	III + IV	44	12,8 – 92,1	50,9	52,3 (21,7)	
Metástase à distância	Sim	42	12,8 – 92,1	53,3	52,8 (20,4)	0,0366
	Não	38	0,0 – 97,8	36,8	40,7 (31,2)	

p-valor obtido pelo teste Mann-Whitney ou *Kruskal-Wallis

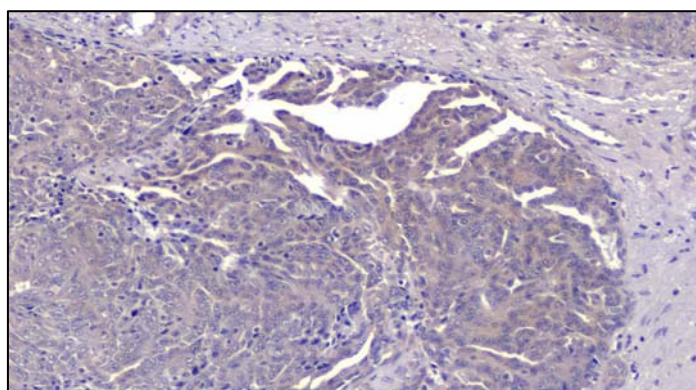
Em relação à expressão de CD44, houve uma associação estatística entre lateralidade do tumor e a expressão desta proteína. Os tumores unilaterais apresentaram maior expressão desta proteína em relação aos tumores bilaterais ($p < 0,0001$). Também foi possível associar a expressão de CD44 com estadiamento clínico ($p < 0,0025$), com metástase à distância ($p = 0,0137$) e com graduação histológica ($p = 0,0274$). Os tumores bem/moderadamente diferenciados, de estádios clínicos iniciais (I e II) e sem metástase à distância apresentaram maior expressão de CD44 quando comparados com as variáveis respectivas (Tabela 7). A Figura 8 mostra imagem representativa das reações de imunoistoquímica para CD44.



A



B



C

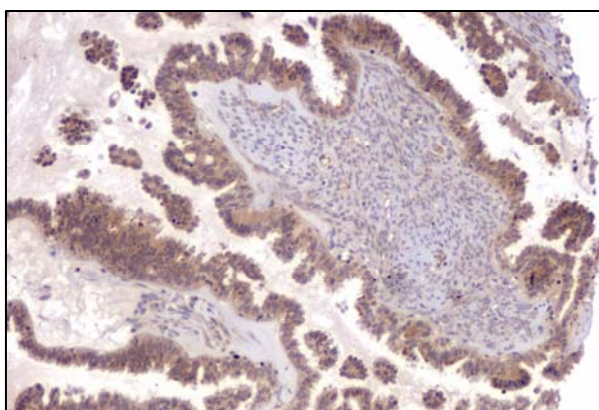
Figura 8 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão da proteína CD44 em tumores epiteliais de ovário, marcação de membrana e citoplasmática. A, tumor *borderline* com CD44 positivo; B, tumor maligno com CD44 negativo; C, tumor maligno com CD44 positivo. Aumento de 200X.

Tabela 7 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão CD44.

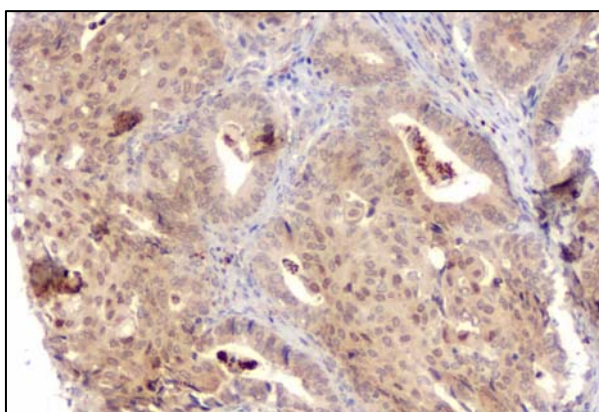
Variável	Categoria	N	Variação	Mediana	Média (dp)	p-valor
Faixa etária (anos)	≤ 53	37	0,8 – 127,0	24,9	42,7 (38,2)	0,1464
	> 53	43	2,4 – 150,7	40,6	51,6 (40,5)	
Tipo patológico	Benigno	13	2,9 – 137,2	30,6	45,6 (39,6)	0,6437*
	Borderline	5	2,7 – 48,8	32,3	28,6 (17,7)	
	Maligno	64	0,8 – 150,7	37,7	49,9 (40,5)	
Lados	Bilateral	41	0,8 – 57,8	24,9	24,8 (14,2)	<0,0001
	Unilateral	34	2,9 – 149,1	61,4	67,2 (42,3)	
Cápsula	Sem invasão	15	2,7 – 127,0	38,4	46,9 (36,6)	0,2505
	Com invasão	39	0,8 – 149,1	26,9	39,4 (36,2)	
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	41	3,6 – 150,7	46,2	55,6 (40,7)	0,0274
	Pouco	18	2,4 – 115,4	25,7	32,6 (26,9)	
Estádio FIGO	I + II	14	19,5 – 149,1	84,8	81,7 (46,9)	0,0025
	III + IV	47	0,8 – 150,7	29,7	37,5 (31,1)	
Metástase à distância	Sim	45	0,8 – 115,4	29,7	35,8 (26,6)	0,0137
	Não	37	2,4 – 150,7	48,8	62,6 (47,1)	

p-valor obtido pelo teste Mann-Whitney ou *Kruskal-Wallis

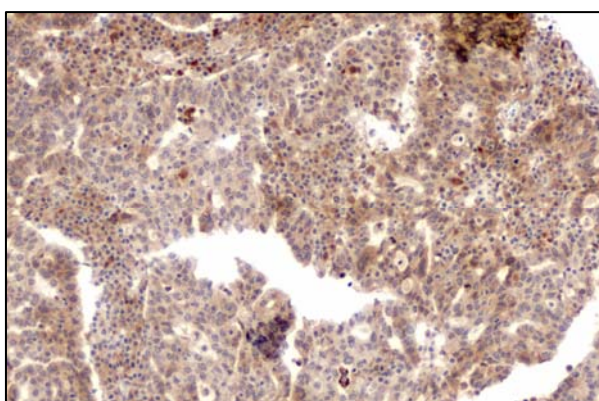
Em relação à expressão da proteína AP-2 γ observamos uma associação entre os lados tumoral ($p < 0,0001$). Os tumores unilaterais expressaram mais AP-2 γ do que os bilaterais. Também foi possível associar a expressão desse marcador com graduação histológica ($p = 0,0263$), onde os tumores pouco diferenciados apresentaram menor expressão de AP-2 γ do que os tumores bem/moderadamente diferenciados. O mesmo foi encontrado em estágio clínico ($p = 0,0004$). Tumores com estágio III e IV apresentaram menor expressão de AP-2 γ e tumores com invasão tumoral tiveram expressão reduzida de AP2 γ ($p = 0,0026$). A Tabela 8 apresenta os resultados da associação entre AP-2 γ e fatores clínico-patológicos. Figura 9 mostra as análises representativas das reações de imunoistoquímica, com a expressão positiva para proteína AP-2 γ em tumores epiteliais de ovário.



A



B



C

Figura 9 - Análise representativa da reação de imunoistoquímica mostrando a expressão positiva da proteína AP-2 γ em tumores epiteliais de ovário, marcação nuclear. A, tumor benigno. B tumor *borderline* e C, tumor maligno. Aumento de 200X.

Tabela 8 - Distribuição das variáveis demográficas, clínicas e relativas ao tumor, de acordo com expressão AP-2γ.

Variável	Categoria	N	Variação	Mediana	Média (dp)	p-valor
Faixa etária (anos)	≤ 53	39	0,6 – 99,8	65,4	63,9 (33,3)	0,9563
	> 53	44	0,0 – 100,0	68,8	63,0 (37,1)	
Tipo patológico	Benigno	17	0,0 – 99,8	65,4	62,7 (35,2)	0,6624*
	Borderline	4	49,6 – 99,2	82,9	78,7 (24,1)	
	Maligno	64	0,6 – 100,0	61,3	61,7 (35,8)	
Lados	Bilateral	41	0,0 – 99,2	38,3	42,9 (30,7)	<0,0001
	Unilateral	37	0,0 – 100,0	98,5	81,3 (27,8)	
Cápsula	Sem invasão	14	6,5 – 100,0	59,0	64,1 (34,6)	0,3334
	Com invasão	40	0,6 – 100,0	48,3	55,2 (35,6)	
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	41	0,6 – 100,0	85,0	68,6 (34,0)	0,0263
	Pouco	18	1,3 – 100,0	38,1	45,6 (34,6)	
Estádio FIGO	I + II	14	45,6 – 100,0	98,6	92,5 (15,9)	0,0004
	III + IV	47	0,6 – 100,0	47,6	53,6 (35,8)	
Metástase à distância	Sim	45	0,6 – 100,0	47,6	52,4 (35,3)	0,0026
	Não	50	0,0 – 100,0	96,4	74,3 (31,3)	

p-valor obtido pelo teste Mann-Whitney ou *Kruskal-Wallis

4.2 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL EM 5-ANOS

Em relação à análise de sobrevida global, o tempo médio analisado foi de 39 meses (desvio padrão=34,2) e mediana de 24,5 meses. Neste período ocorreram 34 óbitos (26%) e a sobrevida global em 5 anos foi de 62,7%.

Foi observada diferença significativa na sobrevida global em 5-anos em relação ao tipo patológico. Pacientes que apresentaram melhor sobrevida foram as portadoras de tumores benignos (87%) e *borderline* (100%) quando comparadas com

as que tinham tumores malignos (55,7%) ($p=0,0434$). Figura 10 mostra o gráfico de sobrevida em relação ao tipo patológico.

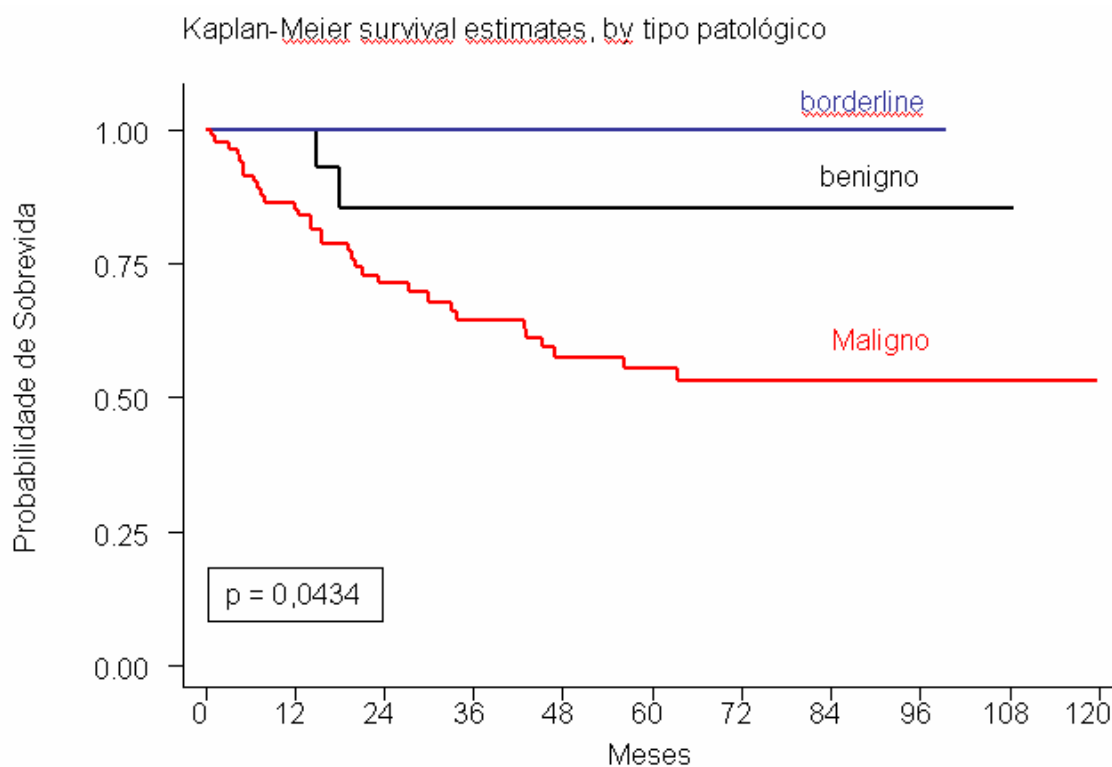


Figura 10 - Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando os tipos patológicos.

Em relação aos lados do comprometimento tumoral, pacientes com tumores unilaterais apresentaram maior sobrevida global em 5-anos (71%) do que as pacientes com tumor bilateral (51%) ($p=0,0136$) (Figura 11). Também pudemos observar houve diferença entre graduação histológica; pacientes com tumores bem ou moderadamente diferenciados apresentaram melhor sobrevida em 5 anos (64,4%) em relação às pacientes com tumores pouco diferenciados (41%) ($p=0,0382$). O mesmo foi mostrado em relação a estadiamento clínico e invasão tumoral, a

sobrevida global em 5 anos foi maior em pacientes com estágio I e II (100%) do que em estágio III e IV (43%) ($p=0,0017$). Pacientes sem invasão tumoral mostraram melhor sobrevida (95%) do que pacientes com invasão tumoral (42%) ($p<0,0001$). As Figuras 12, 13 e 14 mostram os gráficos de sobrevida em 5-anos comparando a graduação histológica, estadiamento clínico e invasão tumoral. As outras variáveis clínico-patológicas analisadas (faixa etária, invasão de cápsula e comprometimento linfonodal) não tiveram diferenças significativas em relação à sobrevida global.

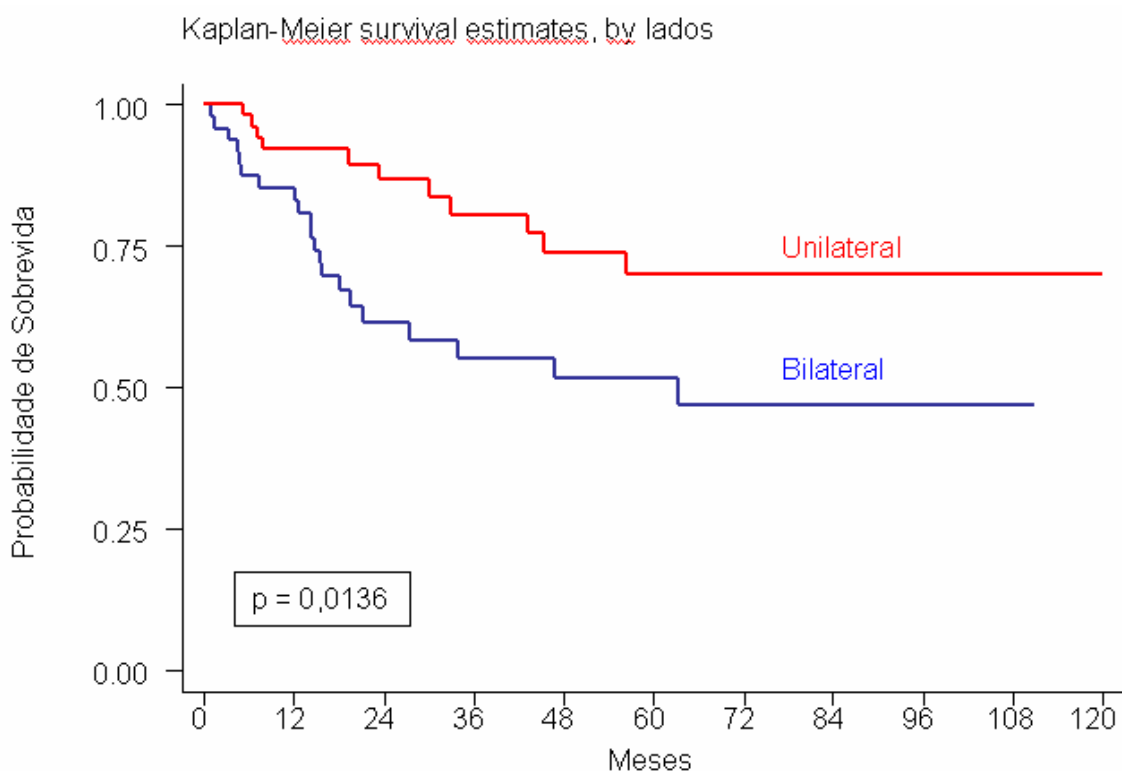


Figura 11 - Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando a lateralidade dos tumores.

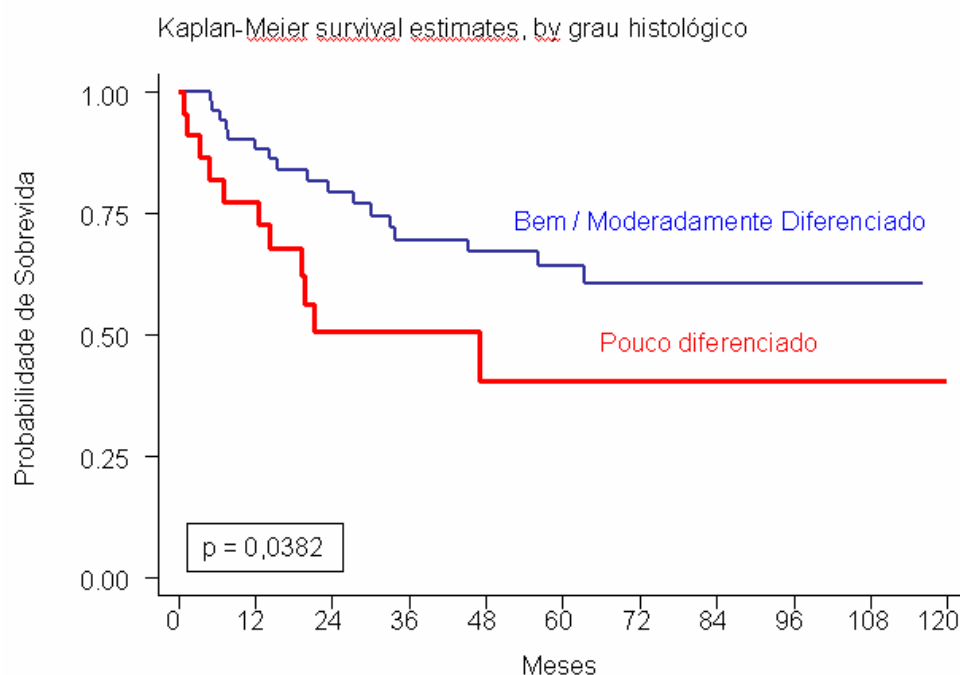


Figura 12 - Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando graduação histológica.

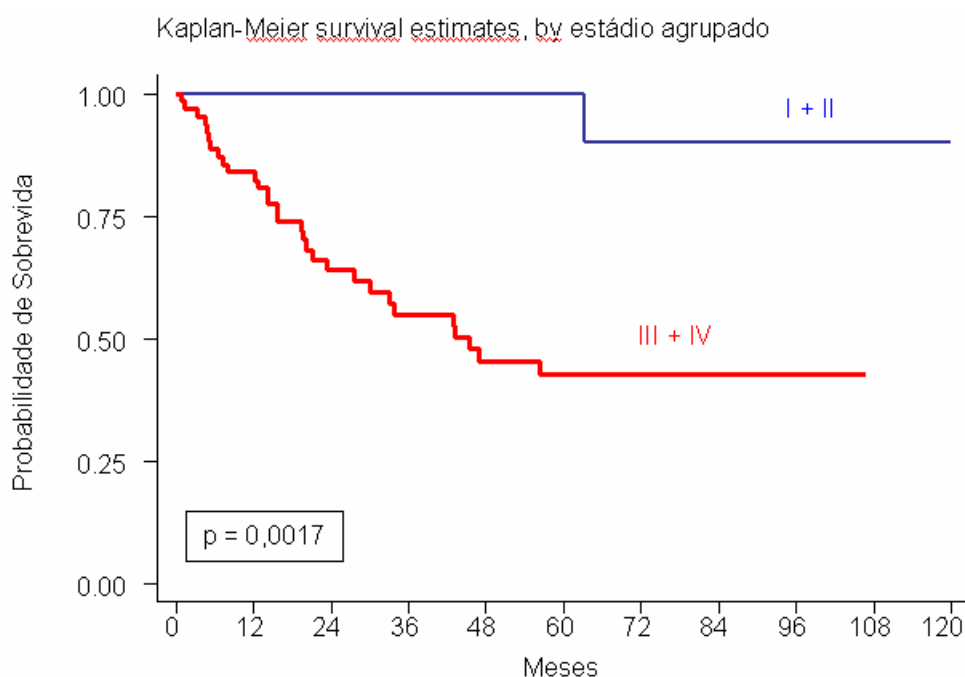


Figura 13 - Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando o estadiamento clínico.

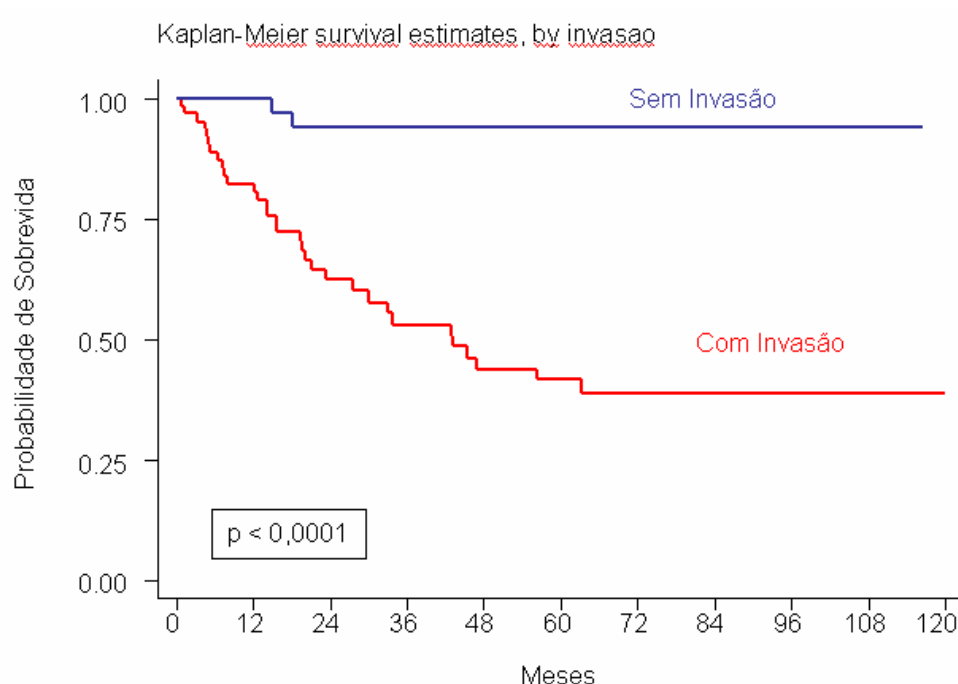


Figura 14 - Curvas de sobrevida global em 5-anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário comparando a invasão tumoral.

Em relação aos marcadores moleculares, as análises de sobrevida foram realizadas com os tumores benigno, *borderline* e maligno e observam-se diferenças nas curvas de sobrevida global em c-Kit, CD44, AP-2 γ e CD133. Pacientes com tumor de ovário com baixa expressão da proteína c-Kit apresentaram melhor sobrevida (87%) do que pacientes com alta expressão desta proteína (40%) ($p=0,0004$). O mesmo foi observado em relação à expressão de CD133. Pacientes com baixa expressão da proteína CD133 tiveram melhor sobrevida (69,8%) do que as com alta expressão da mesma (37%) ($p=0,0269$). As Figuras 15 e 16 mostram os gráficos de sobrevida em relação aos marcadores c-Kit e CD133.

O oposto foi observado em relação à expressão da proteína CD44 e AP-2 γ . Nestes casos foi observado que pacientes com menor sobrevida global foram as que

tiveram expressão reduzida de CD44 (52,7%) e AP-2 γ (44,8%) quando comparadas com as pacientes com tumores com alta expressão de CD44 (84%) e AP-2 γ (74,7%) ($p=0,0221$ e $p=0,0026$, respectivamente) (Figuras 17 e 18).

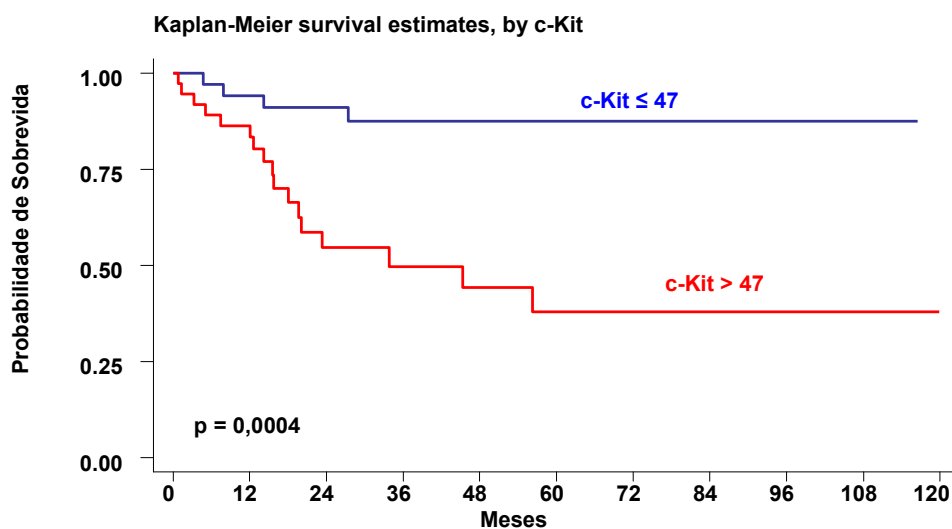


Figura 15 - Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína c-Kit.

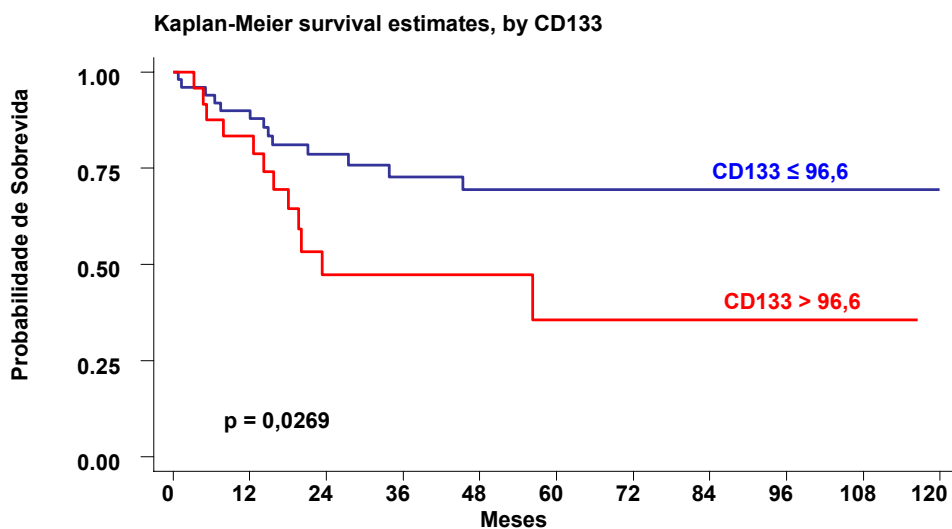


Figura 16 - Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína CD133.

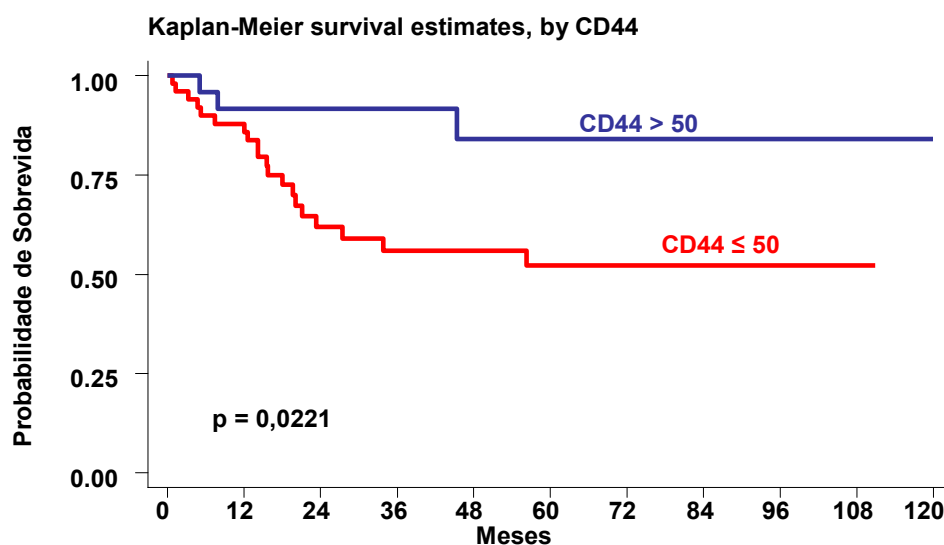


Figura 17 - Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína CD44.

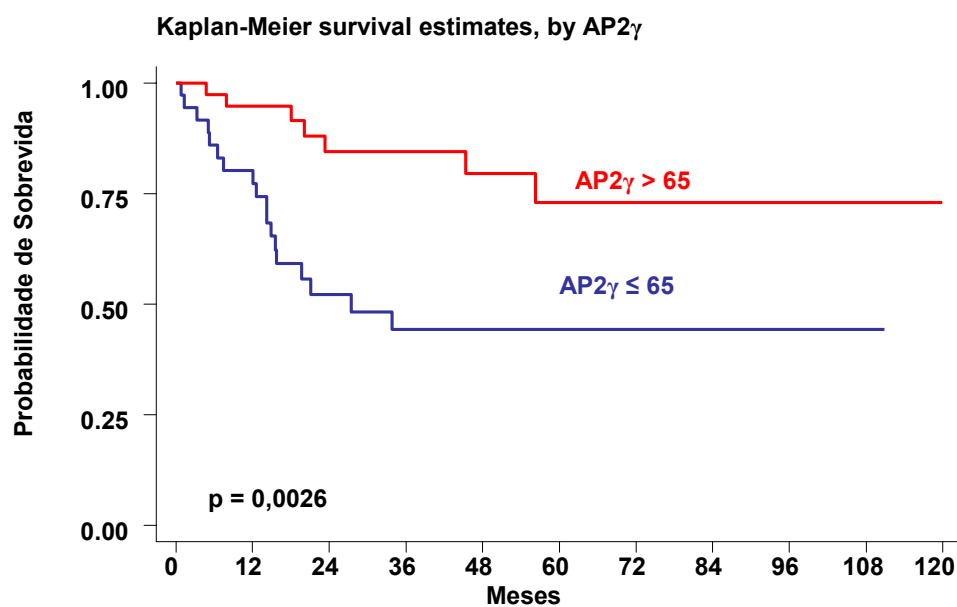


Figura 18 - Curvas de sobrevida global em 5 anos de pacientes portadoras de tumor epitelial de ovário em relação a expressão da proteína AP-2 gama.

4.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA EM 5-ANOS

O tempo médio de recorrência para recidiva foi de 17,2 meses e mediana de 9,8 meses. Neste período ocorreram 33 recidivas. A sobrevida livre de recidiva foi de 62%. Notamos diferenças entre as curvas de sobrevida livre de recidiva nas variáveis: tipos patológicos, lateralidade, estadiamento clínico, invasão tumoral. A Tabela 9 mostra a probabilidade de sobrevida livre de recidiva 5-anos de acordo com variáveis demográficas e clínico-patológicas.

Em relação à expressão das proteínas, foi observado que as pacientes com menor frequência de expressão da proteína CD44 mostraram menor sobrevida livre de recidiva (47,8%) do que as pacientes com maior expressão de CD44 (84,2%) ($p=0,0021$) (Figura 19).

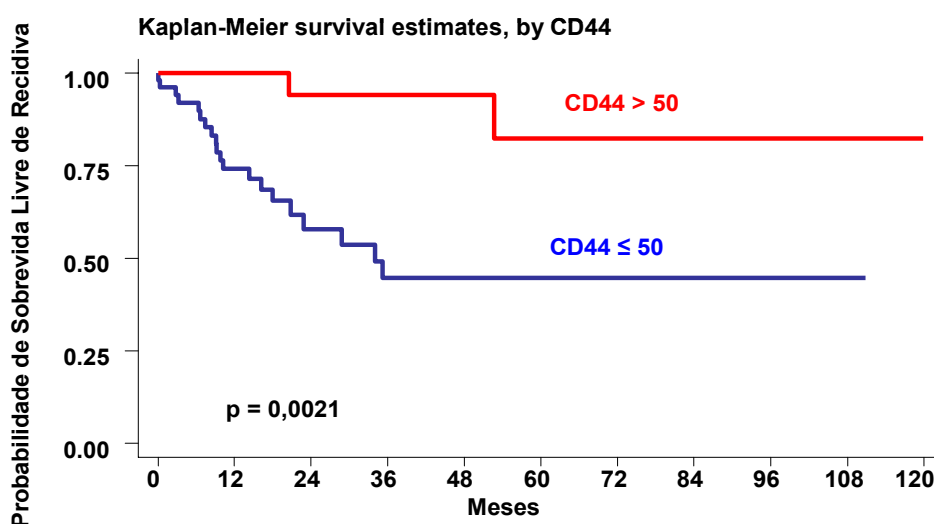


Figura 19 - Curvas de sobrevida livre de recidiva em 5 anos de pacientes portadoras de neoplasias epiteliais de ovário em relação a expressão da proteína CD44.

Tabela 9 - Probabilidade de Sobrevida Livre de Recidiva 5-anos de acordo com variáveis demográficas e clínico-patológicas.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida (%)	p-valor
Faixa etária (anos)	≤ 53	74,8	0,2359
	> 53	52,2	
Tipo patológico	Benigno	100,0	0,0012
	Borderline	100,0	
	Maligno	50,2	
Lados	Bilateral	41,0	0,0287
	Unilateral	75,6	
Cápsula	Sem invasão	63,8	0,3975
	Com invasão	45,9	
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	46,8	0,9111
	Pouco	63,0	
Estádio FIGO	I + II	85,4	0,0010
	III + IV	36,0	
Metástase à distância	Sim	36,9	< 0,0001
	Não	91,6	
p-valor obtido pelo teste de log-rank			

A Tabela 10, análise univariada da sobrevida global em 5-anos, mostra a estimativa dos riscos relativos de morte das variáveis que mostraram curvas de sobrevida significativas. Pela análise de seus resultados, pode-se perceber que corroboram não apenas o que já está estabelecido na literatura, como por exemplo, o fato de tipo patológico maligno e estágio clínico avançado apresentarem riscos relativos maiores para pior prognóstico, como também nossos achados. Assim como foi observado pela análise univariada, c-Kit e CD133 expressos em alta quantidade representam fatores de risco de pior prognóstico para câncer de ovário epitelial.

Após realização da técnica *stepwise*, o modelo multivariado de regressão de Cox (Tabela 11) mostrou que somente c-Kit e lados foram fatores prognósticos

independentes. Portanto, c-Kit e lados mostram serem possíveis fatores prognósticos independentes para óbito.

Devido à pequena casuística, esses resultados devem ser considerados com cautela. Para este modelo multivariado, somente 71 casos foram considerados, que foi a casuística com informação disponível. Nesses 71 casos, somente 20 óbitos ocorreram, o que permitiu somente a inclusão de duas variáveis ao modelo. Mais estudos serão necessários, com maior casuística com relação aos marcadores e um seguimento maior para obtenção de eventos.

Tabela 10 - Análise univariada. Risco relativos (RR) para morte e respectivos intervalos de confiança de 95% estimados pelo modelo de regressão de Cox.

Variável	Categoria	RR (95% IC) Univariado
Tipo patológico	Benigno	1,0 (ref)
	Maligno	3,95 (0,9 – 16,5)
Lados	Bilateral	1,0 (ref)
	Unilateral	0,41 (0,2 – 0,8)
Graduação histológica	Bem/Moderadamente	1,0 (ref)
	Pouco	2,20 (1,0 – 4,7)
Estádio clínico	I + II	1,0 (ref)
	III + IV	12,23 (1,7 – 89,9)
Metástase à distância	Sim	1,0 (ref)
	Não	0,07 (0,0 – 0,3)
c-Kit	≤ 47	1,0 (ref)
	> 47	5,84 (1,9 – 17,5)
CD44	≤ 50	1,0 (ref)
	> 50	0,27 (0,1 – 0,9)
AP-2γ	≤ 65	1,0 (ref)
	> 65	0,28 (0,1 – 0,7)
CD 133	≤ 96,6	1,0 (ref)
	> 96,6	2,38 (1,1 – 5,2)

Tabela 11 - Fatores prognósticos independentes - Riscos relativos para morte e respectivos intervalos de confiança de 95% estimados pelo modelo de regressão de Cox.

Variável	Categoria	RR (95% IC) Bruto	RR (95% IC) Multivariado
c-Kit	≤ 47	1,0 (ref)	1,0 (ref)
	> 47	5,84 (1,9 – 17,5)	6,42 (2,1 – 19,6)
Lados	Bilateral	1,0 (ref)	1,0 (ref)
	Unilateral	0,41 (0,2 – 0,8)	0,21 (0,1 – 0,6)

5 DISCUSSÃO

As CTTs são especialmente significativas em relação à resistência às drogas, latência dos tumores, doenças residuais e recorrência (SENGUPTA e CANCELAS 2010).

O isolamento e identificação de células-tronco em tumores sólidos têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas. Alguns parâmetros clássicos como, isolamento de clones de CTTs, análise da sobrevivência dessas células, avaliação dos marcadores de superfície, efluxo de corantes, têm sido aplicados juntos para identificar e isolar CTTs. Em muitos tumores tem sido possível identificar as células-tronco tumorais, dentre eles: próstata, cólon, fígado, mama. Essas células vêm sendo também identificadas em tumores por meio da expressão de alguns marcadores de superfície, dentre os quais encontram-se: CD133, Nestina, CD44, c-KIT e AP-2 γ (HILL e PERRIS 2007).

CD133 (Prominina-1) é uma glicoproteína transmembrânica, expressa em células-tronco hematopoéticas, células-tronco epiteliais e CTTs. CD133 foi primeiramente usada como marcador de célula-tronco hematopoética (MIRAGLIA et al. 1997). Em tumores do sistema nervoso central, como glioma e neuroblastoma, também têm sido identificadas células CD133⁺ (SINGH et al. 2004; LIU et al. 2006). Em tumores de próstata, pâncreas, pele, cólon também têm sido encontradas CTTs com expressão positiva de CD133 (COLLINS et al. 2005; YIN et al. 2007; MONZANI et al. 2007).

Pouco se sabe sobre a função de CD133, mas recentes relatos demonstram que sua expressão pode ser dependente do ciclo celular e da proliferação. Alguns autores sugerem que CD133 pode ser identificado apenas em CTTs ou em células progenitoras. Entretanto, tumores com células CD133⁻ ainda demonstram propriedade de células-tronco, como auto-propagação, diferenciação e formação de tumores em xenotransplantes (FERRANDINA et al. 2009).

Algumas evidências suportam a hipótese de que CD133 é um marcador candidato a identificar CTTs em tumor de ovário. FERRANDINA et al. (2008), observaram que as células dos tumores de ovário CD133⁺ tinham maior capacidade proliferativa e clonogênia do que as células CD133⁻. BABA et al. (2008), em estudo com células CD133⁺ derivadas de ascite de tumor primário de ovário, notaram que essas células foram capazes de auto-propagar e que se associaram com aumento da agressividade tumoral em xenotransplantes, mais do que com células CD133⁻. Também observaram aumento de resistência à terapia baseada em platina e outras drogas usadas para tratamento de tumor de ovário. Além disso, esses autores também relataram provável tumorigenicidade da expressão de CD133 em tumor de ovário. Observaram que fenômenos epigenéticos em CD133, como metilação no promotor e modificação de histonas, podem estar associados à transformação maligna. Mais recentemente, outro estudo identificou que o tumor de ovário contém população de CTTs com CD133⁺. Estas células foram capazes de gerar um tumor heterogêneo, em xenotransplantes, similar ao tumor do qual foi originado (CURLEY et al. 2009).

Em nosso estudo observamos que a proteína CD133 foi expressa em maior quantidade em tumores benignos, embora sem significância estatística. Foi mais expressa em tumores pouco diferenciados em relação aos bem/moderadamente

diferenciados, embora também sem significância. Podemos sugerir o envolvimento de CD133 na capacidade de propagação e malignização de tumores de ovário. Contudo, não pudemos associar a expressão positiva de CD133 com as características clínico-patológicas do tumor de ovário. Apesar de não se saber exatamente a função da proteína CD133, notamos que a sobrevida global foi maior em pacientes com baixa expressão da mesma ($p=0,0269$), o que corrobora os achados acima, ou seja, parece que CD133 está envolvida no processo de malignização.

FERRANDINA et al. (2009), em análise da expressão de CD133 por imunohistoquímica em 160 tumores de ovário, observaram maior expressão desta proteína em tumores com grau histológico avançado e em estágio FIGO III. Porém, ao contrário do nosso estudo, esses autores não encontraram diferença nos tempos de sobrevida global e livre de progressão de acordo com o *status* de CD133.

KUSUMBE et al (2009) caracterizaram as células CD133⁺ em modelos *in vitro* e *in vivo* e verificaram que as células CD133⁺ podem contribuir para o estabelecimento da vascularização do tumor, que é um fenômeno crítico para a sobrevida durante a progressão do tumor. Demonstraram que células CD133⁺ são recrutadas para gerar microvasos tumorais através da neoangiogênese.

A proteína AP-2 age como fator de transcrição e está envolvida em muitas neoplasias. Existem poucos trabalhos relatando o envolvimento da proteína AP-2 γ em cânceres humanos, quase todos são relacionados ao AP-2 α . Em tumores de ovário, os estudos com AP-2 são escassos. ANTTILA et al. (2000) mostraram que em ovário normal havia expressão da proteína AP-2 α apenas no citoplasma e em carcinomas foram observados expressão desta proteína no citoplasma e núcleo. Os autores observaram que os pacientes com carcinoma de ovário que apresentaram

expressão nuclear de AP-2 α e ausência de coloração no citoplasma tiveram pior sobrevida. ØDEGAARD et al (2006), analisaram a expressão nuclear de AP-2 γ em carcinomas de ovário comparando lesões benigna e *borderline*. Os autores observaram que os carcinomas em estágio avançado só apresentaram marcações nucleares enquanto os carcinomas em estádios iniciais e tumores *borderline* apresentaram imuno-reatividade no núcleo e no citoplasma, sugerindo que diferentes isoformas de AP-2 γ podem estar envolvidas na evolução de diferentes tipos de câncer.

No presente estudo foi avaliada a expressão nuclear de AP-2 γ , mas diferente dos achados de ØDEGAARD et al. (2006), não encontramos associação entre expressão da proteína AP-2 γ e os tipos patológicos do tumor. Entretanto, a alta expressão nuclear de AP-2 γ previu piores sobrevidas global ($p=0,0026$) e livre de recidiva ($p=0,0978$). AP-2 γ foi mais expressa em tumores unilaterais ($p<0,0001$) em relação aos bilaterais, bem/moderadamente diferenciados ($p=0,0263$) em relação aos pouco diferenciados, em estádios FIGO iniciais ($p=0,0004$) e em tumores não invasivos ($p=0,0026$).

CD44 é uma glicoproteína que se liga com alta afinidade a glicosaminoglicanas hialurônicas encontradas na matriz extracelular. Tem afinidade também por outros componentes da matriz como fibronectina, colágeno tipo IV e laminina (ARUFFO et al. 1990). É considerado um dos marcadores mais usados para identificar subpopulações de células tumorigênicas. Recentemente, foi demonstrado que CD44 é um útil marcador para isolar CTTs de carcinoma de ovário (ZHANG et al. 2008). Foi descrito que a adesão de células de carcinoma de ovário à monocamada de células mesoteliais e que a migração destas células através da

ligação com proteínas fibronectina, colágeno tipo IV e laminina são mediadas por CD44, *in vitro* (STROBEL et al. 1997; CASEY e SKUBITZ 2000).

Em nosso estudo, não foi encontrada diferença estatística na expressão de CD44 em relação ao tipo patológico. Foi encontrada alta expressão de CD44 em tumores com melhor prognóstico: tumores unilaterais ($p=0,0001$), bem/moderadamente diferenciados ($p=0,0274$), estádios FIGO iniciais ($p=0,0025$) e tumores não metastáticos ($p=0,0137$). Ainda, observamos que as sobrevidas global ($p=0,0221$) e livre de recidiva ($p=0,0221$) em 5-anos foram maiores em pacientes com alta expressão de CD44.

Assim como em nosso estudo, alguns grupos mostraram expressão da proteína CD44 em carcinoma epitelial de ovário (BAPAT et al. 2005; ZHANG et al. 2008). BAPAT et al. (2005) isolou clones de ascite de carcinoma seroso de ovário grau IV e observou que 30% dos clones foram imortalizados, mostrando variação morfológica e de crescimento e que a maioria apresentou super expressão de CD44. ZHANG et al. (2008) também identificaram e caracterizaram CTTs em cultura primária de células de adenocarcinoma seroso de ovário humano e mostraram que essas células superexpressaram CD44. As células com esse fenótipo apresentaram alta tumorigenicidade, enquanto que as células CD44⁻ permaneceram não tumorigênicas.

Os nossos resultados corroboram os resultados de CONCIN et al. (2003) que encontraram, por meio da técnica de IHC, expressão de CD44 em apenas 19% dos tumores de epiteliais de ovário; em 11% dos casos mostraram expressão positiva da variante CD44v6. Mas diferente do nosso, os autores não encontraram nenhuma associação entre a expressão de CD44 e sobrevida global e livre de doença.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. (2003), analisaram a expressão da proteína CD44 por IHC e, semelhante aos resultados do presente trabalho, mostraram associação com sobrevida. Pacientes que apresentaram baixa expressão de CD44 tiveram menor sobrevida em relação aos que apresentaram alta expressão de CD44.

Usando um TMA contendo 23 tumores serosos benignos, 40 *borderline* e 95 malignos, também pela técnica de IHC, CHO et al. (2006) observaram que a super expressão de CD44 foi mais freqüente em tumores *borderline* do que em tumores benignos e malignos. Os autores observaram associação entre a expressão de CD44 e estágio tumoral e grau histológico, resultados semelhantes aos nossos, pois os tumores com estágio clínico avançado e alto grau histológico apresentaram menor freqüência de expressão de CD44 em relação aos tumores em fase inicial e de baixo grau.

Embora a expressão de CD44 tenha sido identificada como marcadora de CTT, neste trabalho não pudemos constatar sua importância em relação ao tipo patológico. Contudo, apesar das controvérsias na literatura, CD44 tem sido investigado como marcador para prognóstico em tumor de ovário. Alguns investigadores têm demonstrado associação entre CD44 e fatores de prognósticos e sobrevida, enquanto outros não demonstraram qualquer associação. Os nossos resultados sugerem que a expressão de CD44 é diminuída durante a progressão do tumor e sobrevida. Pode ser que a redução na expressão dessa molécula reduza a adesão célula-célula podendo ser um evento para o avanço tumoral e metástase.

O proto-oncogene c-Kit codifica o receptor transmembrânico tirosina-quinase, tendo papel na transdução de sinal. C-kit é um componente chave do controle da proliferação celular, diferenciação e metástase. A proteína Kit é ativada

pelo seu ligante, (Kit ligante, KL) para induzir a proliferação, reparo, diferenciação, migração e sobrevivência celular (ERDOGAN et al, 2007). A mutação ou super expressão de c-kit pode desorganizar o crescimento celular e resultar na formação do tumor. A proliferação de células orientadas por Kit em resposta ao seu ligante, KL, tem sido relatada em numerosas patologias e vários tumores humanos, como tumor estromal gastrointestinal (GISTS), tumores de pulmão, ovário, células germinativas, células-tronco hematopoéticas, em mastocitose, endometriose, melanoma e tumores epiteliais (MIETTINEN E LASOTA 2005).

A proteína c-Kit tem sido usada como marcador para CTTs. Em estudos de identificação de CTT, em de câncer de ovário, observaram que as células com características de CTTs apresentaram expressão de c-Kit positiva (BAPAT et al. 2005; SZOTEK et al. 2006; ZHANG et al. 2008).

Muitos estudos têm investigado a expressão de c-Kit no epitélio maligno de ovário por imunoistoquímica. Estes estudos têm incluído tipos histológicos heterogêneos fornecendo resultados bastante diferentes. Tem sido relatado que a expressão de c-kit estende-se de 0 a 87% em tumores de ovário (MIETTINEN E LASOTA 2005).

Um dos primeiros relatos sobre a expressão de c-kit em tumor ginecológico foi feito por INOUE et al (1994). Tumores benignos e malignos de ovário foram estudados e observou-se que dos 9 carcinomas serosos estudados, 22% apresentaram expressão de c-Kit. Outro estudo com 567 tumores de diferentes órgãos relatou positividade de c-kit em 87% dos casos de diferentes tipos histológicos de carcinoma de ovário (ARBER et al. 1998). KHALIFEH et al (2005) estudaram 118 casos de

carcinoma seroso de ovário de alto grau e observaram que 21% dos casos apresentaram expressão de c-kit.

No presente trabalho observamos que cerca de 50% dos tumores analisados apresentaram a expressão de c-Kit. Observamos uma associação entre metástase tumoral e expressão de c-Kit, ou seja, em tumores com invasão a expressão de c-Kit foi maior do que em tumores sem invasão ($p=0,0366$). SCHMANDT et al. (2003), estudaram carcinomas de ovário de baixo e alto grau e observaram que c-Kit foi expressa em 26% dos tumores de alto grau e nenhum tumor de baixo grau apresentou positividade para essa proteína. Em nosso estudo, pudemos observar também que pacientes com baixa expressão de c-Kit tiveram maior sobrevida global em 5-anos do que pacientes com alta expressão de c-kit, podendo ser um possível fator prognóstico independente. Resultados opostos foram encontrados por KHALIFEH et al. (2005), que observaram que a falta de c-kit está associada à curta sobrevida em pacientes com carcinoma seroso de ovário. O mesmo foi observado por TONARY et al. (2000) que estudaram diferentes tipos de tumor epitelial de ovário, relatando curta sobrevida em pacientes com baixa expressão de c-kit. Os autores hipotetizaram que seus achados de melhora na sobrevida com alta expressão de c-Kit podem ser um resultado da localização citoplasmática ao invés da localização usual na membrana, que pode contribuir com a disfunção de c-kit.

Os nossos resultados corroboram com os dados da literatura que afirmam que a super expressão de c-Kit pode levar ao pior prognóstico em tumor de ovário. LASSUS et al. (2004), associaram a positividade de c-Kit com alto grau histológico, alto índice proliferativo e baixa sobrevida. Outro estudo sugeriu que positividade de

c-Kit em carcinoma de ovário está associada à resposta ruim à quimioterapia (RASPOLINI et al., 2004).

Nestina é um filamento intermediário de proteínas do citoesqueleto, que foi identificada pela primeira vez em células-tronco neuroepiteliais. É amplamente expressa durante embriogênese de mamíferos. Encontra-se em níveis abundantes durante fases iniciais da neurogênese do sistema nervoso central (SNC) e periférico, sugerindo que células Nestina positivas sejam cruciais para o desenvolvimento embrionário neural. A expressão de Nestina também está presente em outros tecidos como retina, derme, pâncreas, trato gastrointestinal, alguns tecidos adultos normais, alguns tecidos adultos lesionados ou em tumores malignos (WIESE et al. 2004). Em tecidos diferenciados, Nestina é pouco expressa, mas pode ser superexpressa em tecidos adultos sob certas condições patológicas, como em lesões no SNC e no tecido muscular e em tumores neuroepiteliais, o que pode demonstrar remodelação ou reversão de um fenótipo imaturo. Assim, a sua expressão pode indicar população de CTTs (WIESE et al. 2004; FUSI et al. 2010).

Existem poucos trabalhos na literatura relatando o envolvimento de Nestina em CTTs em tumor de ovário. BAPAT et al. (2005), analisaram marcadores específicos de CTTs e encontraram Nestina expressa em clones caracterizados como CTTs em câncer de ovário. Outros dois trabalhos também encontraram Nestina presente em CTT de tumor de ovário. LAI et al (2009), estudaram células de tumor primário de ovário de alto grau e observou, por meio das técnicas de PCR quantitativa e citometria de fluxo, superexpressão de marcadores de célula-tronco, como Nang, Oct-4, Sox-e, Nestina, ABCG2, CD133 e CD117 (c-Kit). GAO et al. (2010), isolaram uma série de clones com crescimento heterogêneo de tumores de

ovário. Experimentos *in vitro* desses clones revelaram que se tratava de subpopulações de CTTs que permaneceram quiescentes, quimioresistentes e que foram positivos para Nestina e outros marcadores de células-tronco tumorais.

Nosso estudo fez uma associação entre a proteína Nestina e parâmetros clínico-patológicos. Observamos que a alta expressão de Nestina foi associada ao pior prognóstico. Em tumores malignos foi encontrada maior expressão de Nestina do que nos outros tipos patológicos ($p=0,0499$). Em tumores metastáticos também foi possível observar maior expressão desta proteína ($p=0,0087$).

Em outros tumores, o valor prognóstico de Nestina também foi identificado, como por exemplo, astrocitoma e melanoma, onde Nestina foi observada como indicador da desdiferenciação celular e progressão (EHRMANN et al. 2005). Em melanoma, Nestina foi encontrada como um marcador adicional em células circulantes de melanoma (FUSI et al. 2010). O filamento Nestina foi associado à migração e metástase em tumor de próstata (KLEEBERGER et al. 2007).

6 CONCLUSÕES

Com esse trabalho pudemos sugerir que:

- A expressão da proteína CD133 está presente em todos os tipos patológicos do tumor epitelial de ovário e que está relacionada a pior sobrevida, fornecendo informações úteis quando ao prognóstico da doença.
- Baixa expressão da proteína AP-2 γ pode predizer prognóstico ruim e curta sobrevida em pacientes com tumores de ovário.
- A expressão reduzida de CD44 está envolvida na progressão do tumor e piores sobrevida global e livre de recidiva em 5-anos.
- A expressão elevada de c-Kit está associada ao pior prognóstico e menor sobrevida em mulheres portadoras de tumor epitelial de ovário.
- A expressão aumentada da proteína Nestina associou-se a pior prognóstico em pacientes com tumores de ovário.

Concluimos que as proteínas relacionadas a CTTs estão presentes em vários tipos de tumores epiteliais de ovário e que a expressão dessas moléculas pode ser uma ferramenta útil para avaliar o prognóstico desses tumores. Embora os marcadores avaliados neste trabalho estejam relacionados à presença de CTTs, não podemos afirmar com certeza que essa população de células que expressou CD133, AP-2 γ , CD44, c-Kit e Nestina seja realmente CTT.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. **Clin Oncol** 2004; 23:12-39.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:3983-8.

Alvero AB, Chen R, Fu HH, et al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. **Cell Cycle** 2009; 8:158-66.

Anttila MA, Kellokoski JK, Moisio KI, et al. Expression of transcription factor AP-2alpha predicts survival in epithelial ovarian cancer. **Br J Cancer** 2000; 82:1974-83.

Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. **Hum Pathol** 1998; 29:498-504.

Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al. intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **N Engl J Med** 2006; 354:34-43.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell** 1990; 61:1303-13.

Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T. Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. **Development** 2002; 129:2733-47. Erratum in: **Development** 2002; 129:3280.

Baba T, Convery PA, Matsumura N, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. **Oncogene** 2009; 28:209-18.

Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. **Cancer Res** 2005; 65:3025-9.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med** 1997; 3:730-7.

Cadron I, Leunen K, Gorp TV, Amant F, Neven P, Vergote I. Management of Borderline Ovarian Neoplasms. **J Clin Oncol** 2007; 25:2928-37.

Cannistra SA, Gerhenson DM, Recht A. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: De Vita Jr V, Lawrence TS, Rosenberg AS, editors. **De Vita, Hellman, Rosenberg's Cancer principles e practice of oncology**. 8th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p.1568-94.

Casey RC, Skubitz AP. CD44 and beta1 integrins mediate ovarian carcinoma cell migration toward extracellular matrix proteins. **Clin Exp Metastasis** 2000; 18:67-75.

Chien JR, Aletti G, Bell DA, Keeney GL, Shridhar V, Hartmann LC. Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer. **J Cell Biochem** 2007; 102:1117-29.

Cho EY, Choi Y, Chae SW, Sohn JH, Ahn GH. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. **Pathol Int** 2006; 56:62-70.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Res** 2005; 65:10946-51.

Concin N, Hefler L, van Bavel J, et al. Biological markers in pT1 and pT2 ovarian cancer with lymph node metastases. **Gynecol Oncol** 2003; 89:9-15.

Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro) epithelial cell differentiation. **FEBS Lett** 2010; 584:1659-64.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. **Robbins pathologic basis of disease**. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004, p.959-71.

Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. **Stem Cells**. 2009 Dec;27(12):2875-83.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: model and concepts. **Ann Rev Med** 2007; 58:267-84.

Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, et al. Genetic evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion Molecule-1(PECAM-1):CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-Independents Functions. **J Immunol** 1999; 162:3022-30.

Eagle K, Ledermann JA. Tumor Markers in Ovarian Malignancies. *The Oncologist* 1997; 2:324-29.

Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. **Genome Biol** 2005; 6:246.

Ehrmann J, Kolár Z, Mokry J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. **J Clin Pathol** 2005; 58:222-3.

Erdogan G, Bassorgun CI, Pestereli HE, Simsek T, Karaveli S. C-kit protein expression in uterine and ovarian mesenchymal tumours. **APMIS** 2007; 115:204-9.

Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, et al. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2008; 18:506-14.

Ferrandina G, Martinelli E, Petrillo M, Prisco MG, Zannoni G, Sioletic S, Scambia G. CD133 antigen expression in ovarian cancer. **BMC Cancer** 2009; 9:221.

Fleming ID, Edge SB, Byrd DR, et al. **AJCC Cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer, 2010. Ovary and primary peritoneal carcinoma; p.419-28.

Fusi A, Ochsenreither S, Busse A, Rietz A, Keilholz U. Expression of the stem cell marker nestin in peripheral blood of patients with melanoma. **Br J Dermatol** 2010; 163:107-14.

Galligioni E, Arcuri C, Sorio R, Griso C. Gemcitabine and anthracyclines in platinum-resistant ovarian cancer. **Ann Oncol** 2006; 17:195-8.

Gao JX. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. **J Cell Mol Med** 2008; 12:67-96.

Gilbert CA, Ross AH. Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. **J Cell Biochem** 2009; 108:1031-8.

Hamburger A, Salmon SE. Primary bioassay of human myeloma stem cells. **J Clin Invest** 1977; 60:846-54.

Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. **J Clin Oncol** 2002; 20:1693-703.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. **Cell Stem Cell** 2007; 1:313-23.

Hess V, A'Hern R, Nasiri N, et al. Mucinous Epithelial Ovarian Cancer: A Separate Entity Requiring Specific Treatment. **J Clin Oncol** 2004; 6:1040-44.

Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle Control. **Gene** 2000; 260:1-12.

Hill RP, Perris R. "Destemming" cancer stem cells. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1435-40.

Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, et al. Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. **Clin Cancer Res** 2004; 10:8521-30.

Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E, et al. Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** 2008; 56:165-80.

Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. **PloS One** 2009; 4:e8377.

Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T, Kondoh G. Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. **Cancer Res.** 1994, 54(11):3049-53.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:225-49.

Khalifeh I, Munkarah AR, Schimp V, Morris R, Lawrence WD, Ali-Fehmi R. The impact of c-kit and ki-67 expression on patients prognosis in advanced ovarian serous carcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 2005; 24:228-34.

Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, et al. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. **Cancer Res** 2007; 67:9199-206.

Kusumbe AP, Mali AM, Bapat SA. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. **Stem Cells** 2009; 27:498-508.

Lai DM, Liu T, Huang Y, Wang LH, Zhang J, Cheng WW. [Identification and characterization of ovarian cancer stem-like cells from primary tumor.]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi** 2009; 44:936-40.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature** 1994; 367:645-8.

Lassus H, Sihto H, Leminen A, et al. Genetic alterations and protein expression of KIT and PDGFRA in serous ovarian carcinoma. **Br J Cancer** 2004; 91:2048-55.

Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Mol Cancer** 2006; 5:67.

Maenhaut C, Dumont JE, Roger PP, van Staveren WC. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. **Carcinogenesis** 2010; 31:149-58.

Makino S. The role of tumor stem-cells in regrowth of the tumor following drastic applications. **Acta Unio Int Contra Cancrum** 1959; 15:196-8.

Markman M, Bookman MA. Second-Line Treatment of Ovarian Cancer. **Oncologist** 2000; 5:26-35.

McDonald SA, Graham TA, Schier S, Wright NA, Alison MR. Stem cells and solid cancers. *Virch Arch* 2009; 455:1-13.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Brasil. **Estimativas/2010 incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. **Eur J Cancer** 2007; 43:935-46.

Menon U, Skates SJ, Lewis S, et al. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:7919-26.

Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13:205-20.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. **Blood** 1997; 90:5013-21.

Möbus V, Wandt H, Frickhofen N, et al. Phase III trial of high-dose sequential chemotherapy with peripheral blood stem cell support compared with standard dose chemotherapy for first-line treatment of advanced ovarian cancer: intergroup trial of the AGO-Ovar/ AIO and EBMT. **J Clin Oncol** 2007; 27:4187-93.

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

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature** 2007; 445:106-10.

Ødegaard E, Staff AC, Kaern J, et al. The AP-2gamma transcription factor is upregulated in advanced-stage ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol** 2006; 100:462-8.

Ozols EF. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. **Ann Oncol** 2006; 5:181-7.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Pignata S, Pisano C, Di Maio M, et al. Symposium Article: Medical treatment of resistant or recurrent epithelial ovarian cancer. **Ann Oncol** 2006; 7:49-50.

Ponnusamy MP, Batra SK. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. Review. **J Ovarian Res** 2008; 1:4.

Rajan P, Srinivasan R. Targeting cancer stem cells in cancer prevention and therapy. **Stem Cell Rev** 2008; 4:211-6.

Raspolini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Taddei A, Taddei GL. c-KIT expression and correlation with chemotherapy resistance in ovarian carcinoma: an immunocytochemical study. **Ann Oncol** 2004; 15:594-7.

Rhijn BWGV, Vis AN, Kwast THVD, Kirkels Wj, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. **J Clin Oncol** 2003; 21:1912-21.

Rodríguez-Rodríguez L, Sancho-Torres I, Mesonero C, Gibbon DG, Shih WJ, Zotalis G. The CD44 receptor is a molecular predictor of survival in ovarian cancer. **Med Oncol** 2003; 20:255-63.

Rubatt JM, Darcy KM, Hutson A, et al. Independent prognostic relevance of microvessel density in advanced epithelial ovarian cancer and associations between CD31, CD105, p53 status, and angiogenic marker expression: A Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2009; 112:469-74.

Schmandt RE, Broaddus R, Lu KH, et al. Expression of c-ABL, c-KIT, and platelet-derived growth factor receptor-beta in ovarian serous carcinoma and normal ovarian surface epithelium. **Cancer** 2003; 98:758-64.

Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. **Bioessays** 2009; 31:1038-49.

Sengupta A, Cancelas JA. Cancer stem cells: a stride towards cancer cure? **J Cell Physiol** 2010; 225:7-14.

Sever M, Jones TD, Roth LM, et al. Expression of CD117 (c-kit) receptor in dysgerminoma of the ovary: diagnostic and therapeutic implications. **Mod Pathol** 2005; 18:1411-6.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature** 2004; 432:396-401.

Strobel T, Swanson L, Cannistra SA. In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. **Cancer Res** 1997; 57:1228-32.

Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103:11154-9.

Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, et al. Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. **Cancer Res** 1994; 54:4257-60.

Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. **Cancer Cell** 2005; 8:323-35.

Tilly JL, Rueda BR. Minireview: stem cell contribution to ovarian development, function, and disease. **Endocrinology** 2008; 149:4307-11.

Tonary AM, Macdonald EA, Faught W, Senterman MK, Vanderhyden BC. Lack of expression of c-KIT in ovarian cancers is associated with poor prognosis. **Int J Cancer** 2000; 89:242-50.

Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, et al. Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signaling pathways. **Cancer Res** 1998; 58:5466-72.

Varon D, Jackson DE, Shenkman B, et al. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a costimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets. **Blood** 1998; 91:500-7.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:755-68.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression- a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell Mol Life Sci** 2004; 61:2510.

Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? **Cell Commun Signal** 2010; 8:6.

[WHO]. World Health Organization. International Agency for Reserch on Cancer. World Cancer Report. Lyon: IARC Press, 2008.

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. **Cancer Cell** 2008; 13:153-66.

Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. **Int J Cancer** 2007; 120:1444-50.

Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC 133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. **J Biol Chemistry** 2002; 23:20711-6.

Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. **Cancer Res** 2008; 68: 4311-20.

Zhu Z, Hao X, Yan M, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer** 2010; 126:2067-78.

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



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 18 de Agosto de 2009.

À
Dra. Ludmilla Domingos Thomé Chinen

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1255/09
“Análise da Expressão Imunohistoquímica de Proteínas de Células Tronco Tumorais em Neoplasias Ovarianas Epiteliais”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/08/2009, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 09/06/2009, aprovaram a realização do estudo em referência – versão II, datado de Julho de 2009 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa