

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO
PROTEICA DE OLFM4, GRIM-19, NFkB, IKK2 E SUA
RELAÇÃO COM RESPOSTA A QUIMIOTERAPIA
EM PACIENTES COM CARCINOMA SEROSO DE
OVÁRIO DE ALTO GRAU**

FELIPE ILELIS DE BARROS SILVA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

Co-Orientadora: Dra. Iara Sant'Ana Rodrigues

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Felipe Ilelis de Barros

Avaliação do perfil de expressão proteica de OLFM4, GRIM-19, NFKB e IKK2 e sua relação com resposta a quimioterapia em pacientes com carcinoma seroso de ovário de alto grau / Felipe Ilelis de Barros Silva – São Paulo, 2016.

85p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. CISTADENOCARCINOMA SEROSO. 2. NEOPLASIAS OVARIANAS. 3. QUIMIOTERAPIA. 4. RESISTENCIA A MEDICAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS. 5. COMPOSTOS DE PLATINA. 6. RECIDIVA LOCAL DE NEOPLASIA.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à Deus, por ter me capacitado a realizar este trabalho, à companheira da minha vida, Valéria, pelo amor, fidelidade e companheirismo, e aos meus pais, Neir e Fátima, por todo apoio nesta caminhada acadêmica.

“Amar, portanto, é um dos grandes segredos do momento. Amar com um amor especial. Não basta aquele dirigido unicamente à própria família e aos amigos, mas é preciso amar a todos, simpáticos e antipáticos, pobres e ricos, pequenos e grandes, da nossa pátria ou de outra, amigos ou inimigos, a todos”.

Chiara Lubich

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. Rafael Malagoli Rocha**, pela orientação e por ter confiado a mim a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, **Dra. Iara Sant'Ana Rodrigues**, por todo o ensinamento e incentivo. Sou muito grato pela sua ajuda, Iara. Sempre estarei rezando pelo seu sucesso.

À **Msc. Nayra Soares do Amaral**, colega de projeto e grande amiga, por toda ajuda e conhecimento adquirido. Cresci muito com seus conselhos, ensinamentos e discussões, Nayra. Muito obrigado por tudo.

À minha esposa, **Valéria**, por me fazer acreditar que o amor em Deus é fundamental para o nosso crescimento. Seu apoio foi essencial para a concretização deste trabalho.

A toda minha **família e familiares**, por sempre acreditarem em mim.

À **Mariana Rezende Alves**, colega de projeto e amiga, por toda acolhida e elaboração deste trabalho.

À **Dra. Louise de Brot Andrade**, por todo o suporte e aprendizado. Nossas conversas foram muito importantes para o meu crescimento, Louise. Obrigado, de coração.

Aos colegas do grupo **Mol Morphology**, em especial, **Msc. Julio Cirullo Neto**, por todo o apoio.

A todos que convivi nestes dois anos de CIPE, em especial, **Mel** (desde Uberaba), **Fred**, **Kivvi**, **Fer**, **Isa**, **Flavia**, **Bia**, **Bruna**, **Fidalgo** e **Rafael**, muito obrigado pela força de vocês.

Aos colegas da **Patologia Investigativa**, em especial, **Dra. Claudia Malheiros Coutinho-Camillo**.

Ao Núcleo de Epidemiologia e Estatística, em nome do **Dr. Vinicius Calsavara**, por todo o suporte nas análises deste trabalho e ensinamentos em estatística.

Ao patologista **Leonardo Lordello**, por toda disponibilidade, apoio e colaboração.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, em especial ao **Seven, Carlinhos e Marina**, pela importante colaboração, e ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, pelo suporte.

Ao oncologista **Alexandre da Costa**, por toda a parceria e disponibilidade em ajudar em todas as dúvidas e discussões.

Ao Departamento de Ginecologia Oncológica, em especial, ao **Dr. Glauco Baiocchi Neto**.

A toda a **Pós-graduação** da Fundação Antônio Prudente.

À Biblioteca da Fundação Antônio Prudente, em especial a **Sra. Suely Francisco**, pela formatação desta dissertação.

À **FAPESP** e à **CAPES**, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

RESUMO

Silva FIB. **Avaliação do perfil de expressão proteica de OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50, IKK2 e caspase-3 e sua relação com resposta a quimioterapia em pacientes com carcinoma seroso de ovário de alto grau.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Dentre as neoplasias ginecológicas, o câncer de ovário apresenta a maior taxa de mortalidade. O câncer de ovário do tipo epitelial é mais frequente, dentre os quais se destacam os serosos de alto grau. O carcinoma seroso de alto grau de ovário (CSAGO) é um tumor de caráter agressivo, e cerca de 80% das pacientes diagnosticadas com a doença apresentam estadios avançados, com disseminação pélvica e peritoneal, e podem adquirir resistência à quimioterapia baseada em platina. Entretanto, na prática clínica, não há conhecimento sobre marcadores para prever resistência à quimioterapia. Um dos mecanismos de resistência sugerido é a evasão da apoptose, processo resultante do efeito citotóxico da droga na célula. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de proteínas envolvidas com o processo de apoptose, como OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50, IKK2 e caspase-3 e sua associação com resposta a quimioterapia em CSAGO. Também avaliamos a expressão dessas proteínas em tumores primários de alto grau, suas recidivas, e em tumores serosos de baixo grau, *borderline*, e tecidos normais, e correlacionamos a expressão destas com expressão de Caspase-3, parâmetros clínico-patológicos e tempo de sobrevida. Nossos resultados mostraram que IKK2 foi relacionada com resposta à quimioterapia ($p = 0,04$) e esteve presente nos implantes ($p = 0,003$), além de ser um fator de risco para recidiva ($p = 0,026$), e estar associada com pior sobrevida livre de doença ($p = 0,041$). A positividade de IKK2 em associação com NFkB-p65 esteve significativamente presente em pacientes resistentes à quimioterapia

baseada em platina ($p = 0,036$) e associada com uma pior sobrevida global ($p = 0,026$). A positividade de NFkB-p65 também apresentou associação com pior sobrevida global ($p = 0,001$). A expressão de GRIM-19 foi observada em tumores serosos de baixo grau e *borderline* ($p = 0,011$) e associados com melhor sobrevida livre de doença ($p = 0,028$). Entretanto, OLFM4, GRIM-19 e NFkB não exibiram relação com resistência à quimioterapia. Ainda, OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 não apresentaram correlação com a expressão de Caspase-3. O processo de apoptose pode ser uma via chave capaz de conferir resistência ou sensibilidade à terapia com platina. Estudos mais profundos acerca de vias regulatórias de apoptose, incluindo os marcadores aqui estudados, podem ser importantes na tentativa de prover valores prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento de pacientes com câncer de ovário a partir de testes imuno-histoquímicos no momento da biópsia.

SUMMARY

Silva FIB. **[Profile assessment of OLFM4, GRIM-19, NFkBp65, NFkB-p50, IKK2 and caspase-3 protein expression and their relationship with response to chemotherapy in patients with high-grade serous ovarian carcinoma]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Among the gynecologic neoplasms, the ovarian cancer (OC) presents the highest mortality rate. The epithelial type is the most frequent, among which highlight the high-grade serous subtype. The high-grade serous ovarian carcinoma (CSAGO) is an aggressive tumor, and about 80% of the patients diagnosed with the disease are diagnosed in advanced stages, presents pelvic and peritoneal spread, and can acquire resistance to platinum-based chemotherapy. However, there is no knowledge about markers able to predict resistance to chemotherapy in clinical practice. One of the resistance mechanisms proposed is apoptosis evasion that is triggered by drug cytotoxic effect in the cell. In this context, the aim of this study was to evaluate the expression of proteins involved in the apoptosis process, such as OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50 and IKK2, and their association with chemotherapy response in CSAGO. We also evaluated the expression of these proteins in primary high-grade tumors, and paired relapses, in low-grade serous tumors, borderline tumors and normal tissues, and correlated their expression with Caspase-3 expression, clinicopathological parameters, and overall and disease-free survival. Our results showed that IKK2 was related to chemotherapy response ($p = 0.04$) and it was present in the implants ($p = 0.003$). The IKK2 expression was also associated to worse disease-free survival ($p = 0.041$) and it was a risk factor for relapse ($p = 0.026$). The association between IKK2 and NFkB-p65 positivity was significantly present in patients resistant to platinum-based chemotherapy ($p = 0.036$) and it was associated to worse overall survival ($p = 0.026$).

Likewise, the NFkB-p65 positivity was associated to worse overall survival ($p = 0.001$). The GRIM-19 expression was observed in low-grade and borderline tumors ($p = 0.011$) and it was associated to better disease-free survival ($p = 0.028$). Nevertheless, OLFM4, GRIM-19 and NFkB expression did not relate to chemotherapy response. In addition, OLFM4, GRIM-19, NFkB and IKK2 expression did not correlate with Caspase-3 expression. The process of apoptosis can be a key pathway able to confer resistance or sensibility to platinum therapy. Deeper studies on apoptosis regulatory pathways, including the markers studied here, may be important in attempting to provide prognostic and predictive values for response to treatment of patients with ovarian cancer from immunohistochemistry at the time of biopsy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem representativa de CSAGO, corada com hematoxilina e eosina (HE).....	5
Figura 2	Classificação do comportamento clínico de resistência à platina de acordo com a resposta a partir do término da quimioterapia.....	9
Figura 3	Representação esquemática da via de apoptose.....	12
Figura 4	Papel de OLFM4 em mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral.....	15
Figura 5	Modelo de indução a morte celular por IFN/RA.....	18
Figura 6	Via clássica e não clássica de sinalização de NFkB.....	22
Figura 7	Fluxograma de delineamento dos experimentos e análises.....	26
Figura 8	Classificação das pacientes (N=54) de acordo com taxa de resposta a platina e resposta a quimioterapia	29
Figura 9	Curva de sobrevida global de pacientes resistentes, parcialmente sensíveis e sensíveis à platina.....	35
Figura 10	Expressão de OLFM4.....	47
Figura 11	Expressão de GRIM-19.....	48
Figura 12	Expressão de NFkB-p65.....	49

Figura 13	Expressão de NFkB-p50/105.....	50
Figura 14	Expressão de IKK2.....	51
Figura 15	Expressão de Caspase-3.....	52
Figura 16	Expressão de IKK2 ^{positivo} /NFkB-p65 ^{positivo}	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Subtipos histológicos e frequências dos carcinomas epiteliais do ovário.....	3
Tabela 2	Lista dos anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica.....	31
Tabela 3	Características clínico-patológicas das pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau.....	36
Tabela 4	Expressão de OLFM4 e GRIM-19 e dados clínico-patológicos.....	43
Tabela 5	Expressão de NFkB-p65, NFkB-p50/105 e IKK2 e dados clínico-patológicos.....	45
Tabela 6	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística múltipla para variável dependente localização do tumor (implante).....	46
Tabela 7	Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão de Cox para evento de interesse óbito.....	46
Tabela 8	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox para evento de interesse recidiva.....	46
Tabela 9	Correlação entre as expressões de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3.....	53
Tabela 10	Comparação da expressão de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3 entre as expressões positivas e negativas de NFkB-p65, NFkB-p50 e IKK2.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Tumor primário seroso de alto grau
Akt	Proteína quinase B
APAF	“ <i>Apoptotic protease activation fator 1</i> ”; Fator-1 de ativação da protease apoptótica
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATP	Trifosfato de adenosina
BAFF	Receptor da família TNF
Bax	“ <i>Bcl2-associated X protein</i> ”; Proteína X associada ao Bcl2
Bcl2	“ <i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i> ”; Linfoma 2 de célula B de leucemia linfóide crônica
Bcl-XL	“ <i>Bcl2-related gene, long isoform</i> ”; Gene relacionado ao Bcl2, isoforma longa
BCR-ABL	Proteína quinase resultante da translocação do cromossomo Filadélfia
BG/BL	Tumor primário seroso de baixo grau e <i>borderline</i>
BRAF	“ <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i> ”
BRCA	“ <i>Breast cancer gene</i> ”; Gene do câncer de mama
CA125	“ <i>cancer antigen 125</i> ”
CD40	Receptor da família TNF
CO	Câncer de ovário
DISC	“ <i>Death induction signaling complex</i> ”; Complexo de sinalização de indução de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
FADD	“ <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> ”; Domínio de morte associado ao Fas
FAS	Receptor de morte
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GRIM-19	Gene relacionado à mortalidade induzida por IFN- β /ácido retinóico

H2TC	Ferramenta de busca de documentos de paciente
HBOC	Síndrome mama-ovário hereditário
HE4	“ <i>Human epididymis 4</i> ”; Proteína do epidídimo humano 4
HE	Hematoxilina e eosina
CSAGO	“ <i>High grade serous ovarian carcinoma</i> ”; Carcinoma seroso de ovário de alto grau
HR	“ <i>Hazard ratio</i> ”; Razão de riscos
IAP	proteína inibidora da apoptose
IC	Intervalo de confiança
IFN-β	Interferon-beta
IHQ	Imuno-histoquímica
IκB	Proteínas inibidoras κB
IKK	complexo quinase do inibidor κB
IL	Interleucina
Kb	Quilobases
kDa	quilo daltons
KRAS	“ <i>Kirten rat sarcoma</i> ”; Gene da família de oncogenes <i>RAS</i>
MAPK	“ <i>Mitogen-activated kinase</i> ”; Proteína quinase ativada por mitógeno
Máx	Máximo
Mín	Mínimo
N	Número amostral
n	Frequência amostral
NFκB	“ <i>Nuclear factor kappa-beta</i> ”; Fator nuclear kappa-beta
NIK	“ <i>NFκB-inducing kinase</i> ”; Quinase indutora de NFκB
OLFM4	Olfactomedina-4
OR	“ <i>Odds ratio</i> ”; Razão de chances
pb	Pares de bases
p	Nível de significância
PI3K	Fosfatidil inositol 3,4,5 quinase
PS	Parcialmente sensível
R	Resistente
RAG	Recidiva do tumor primário de alto grau

RAS	<i>“rat sarcoma viral oncogene homolog”</i>
RHD	Domínio de homologia Rel
RNA	Ácido ribonucleico
S6	Sensível após seis meses do termino da quimioterapia
S12	Sensível após 12 meses do término da quimioterapia
SL	Síndrome de Lynch
SPSS	<i>“Statistical Package for the Social Sciences”</i>
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TAD	Domínio de ativação da transcrição
TMA	<i>“Tissue microarray”</i> ; Microarranjos de tecidos
TN	Tecido normal
TNF	Fator de necrose tumoral
TP53	Gene da proteína tumoral 53
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Σ	Somatória

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer de ovário	1
1.1.1	Carcinoma seroso de ovário de alto grau (HGSC)	4
1.1.2	Tratamento do HGSC	7
1.2	Mecanismo de apoptose e resistência à quimioterapia	10
1.3	Potenciais biomarcadores para predição de resposta	13
1.3.1	Olfactomedina-4	13
1.3.2	Gene relacionado à mortalidade por IFN- β /ácido retinóico (<i>GRIM-19</i>)..	16
1.3.3	Fator nuclear kappa-beta (NFkB)	19
2	JUSTIFICATIVA.....	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	MÉTODOS E CASUÍSTICA	26
4.1	Coleta de dados	27
4.2	Determinação da expressão de OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50/105 e IKK2.....	29
4.2.1	Construção do Tissue microarray (TMA).....	29
4.2.2	Imuno-histoquímica	30
4.2.3	Análise das proteínas e determinação do score	31
4.3	Análises estatísticas	32
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Caracterização da amostra.....	34
5.2	Avaliação da expressão de OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50/105 e IKK2.....	37

5.2.1	Expressão de OLFM4.....	37
5.2.2	Expressão de GRIM-19	38
5.2.3	Expressão de NFkB-p65.....	39
5.2.4	Expressão de NFkB-p50/105.....	40
5.2.5	Expressão de IKK2.....	40
5.2.6	Expressão de Caspase-3	41
5.2.7	Correlação e comparação entre expressões de OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50/105, IKK2 e Caspase-3	53
5.2.8	Positividade de IKK2 em conjunto com positividade de NFkB-p65	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ANEXOS

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO

Os cânceres ginecológicos compreendem um grupo de neoplasias que podem acometer o colo e corpo uterino, os ovários, a vagina e a vulva (FAUBION et al. 2015). A mais recente estimativa mundial apontou uma incidência superior a um milhão de novos casos diagnosticados por ano, com 500 mil óbitos (FUNG-KEE-FUNG et al. 2015).

Dentre as neoplasias ginecológicas, o câncer de ovário (CO) apresenta a maior taxa de mortalidade (AL BAKIR e GABRA 2014), e é classificada como quinta causa de morte por câncer nos Estados Unidos. A doença acomete principalmente mulheres idosas, com pico de incidência por volta da sexta e sétima década de vida, e que, geralmente, são diagnosticadas tardiamente (CHO e SHIH 2010; JELOVAC e ARMSTRONG 2011). Nos Estados Unidos, a incidência desta doença foi de 21 mil novos casos e 14 mil mortes em 2015 (SIEGEL et al. 2015). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, 3.283 mulheres foram a óbito em 2013 e estima-se que sejam diagnosticados 6.150 novos casos da doença em 2016 (Ministério da Saúde 2016).

Dados clínicos e epidemiológicos sugerem que o desenvolvimento do câncer de ovário se dá por um processo multifatorial, dependente da interação entre fatores genéticos e ambientais. Além da idade, mulheres que

nunca engravidaram e que apresentaram menarca precoce ou menopausa tardia estão dispostas a desenvolver a doença por terem maior número de ovulações durante a vida. A endometriose e a reposição hormonal por mais de cinco anos também podem predispor a paciente a um risco aumentado para a aquisição do CO (VARGAS 2014; MINION et al. 2015).

A maioria dos COs ocorre de maneira esporádica. No entanto, cerca de 15 a 20% dos casos apresentam um componente hereditário (WEISSMAN et al. 2012). A síndrome mama-ovário hereditário (HBOC), relacionada à mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, e a síndrome de Lynch (SL), que envolve a perda de função dos genes de reparo da via do *mismatch repair*, são as principais síndromes hereditárias associadas ao risco de desenvolver CO (AL BAKIR e GABRA 2014). Pacientes portadoras de HBOC ou que apresentam histórico familiar de SL exibem um risco estimado em 30-62% e 8% de desenvolver a doença, respectivamente (WATSON et al. 2008; MINION et al. 2015).

O CO é uma doença notavelmente heterogênea, tanto em níveis celulares quanto moleculares, devido à alta complexidade do tecido ovariano e a vários componentes distintos que estão presentes no ovário (VAUGHAN et al. 2011). Aproximadamente 90% dos casos de CO se desenvolvem a partir de células que revestem o epitélio ovariano, e o restante dos casos podem se desenvolver a partir de células germinativas e células estromais (DAVIDSON e TROPÉ 2015).

Os tumores epiteliais do ovário apresentam cinco principais subtipos histológicos, com suas próprias características morfológicas, moleculares e

clínicas, e, desta forma, são considerados doenças completamente distintas (PRAT 2012a). Estes subtipos histológicos incluem: carcinoma seroso de alto e baixo grau, carcinoma endometrióide, carcinoma de células-claras e carcinoma mucinoso (DAVIDSON e TROPÉ 2015) (Tabela 1). Ainda, os tumores epiteliais são subdivididos em benigno, *borderline* (baixo potencial de malignidade) e maligno, de acordo com o grau de proliferação e atipia nuclear, e se há presença ou ausência de invasão tumoral no estroma (PRAT 2012b).

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

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

Fonte: Adaptado de PRAT (2012a)

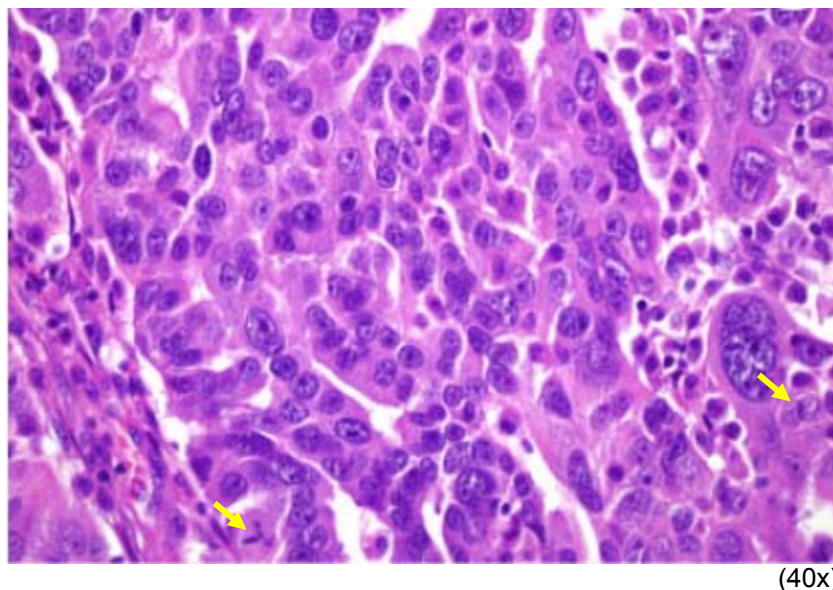
Os carcinomas serosos representam a grande maioria dos tipos de carcinomas epiteliais de ovário (PRAT 2015a). Os carcinomas serosos de baixo grau são tumores menos agressivos, com baixa atividade mitótica e mutações nos oncogenes *KRAS* ou *BRAF*, além de estarem associados a tumores serosos *borderline* (IMAMURA et al. 2015; PRAT 2015b). Por outro lado, os carcinomas serosos de ovário de alto grau são tumores mais agressivos, com elevado índice mitótico e mutações no gene *TP53* (IMAMURA et al. 2015). Apesar de pertencerem ao grupo de carcinomas

serosos, são classificados como doenças completamente diferentes entre si (PRAT 2015b; RAMALINGAM 2016).

1.1.1 Carcinoma seroso de alto grau de ovário (CSAGO)

O CSAGO é o subtipo histológico mais frequente. Este tumor apresenta caráter agressivo, e cerca de 80% das pacientes diagnosticadas com a doença apresentam estadios avançados, com disseminação pélvica e peritoneal (PRAT 2015b).

Em termos morfológicos, o CSAGO apresenta estruturas sólidas de padrão papilífero e com alto grau de diferenciação celular (PRAT 2012a). Segundo MALPICA et al. (2004), neste tumor, é evidenciado um acentuado pleomorfismo nuclear, com núcleo variando em três vezes o tamanho habitual, e alto índice mitótico (>12 mitoses/10 campos) (Figura 1).



Fonte: Adaptado de PRAT (2012a).

Figura 1 - Imagem representativa de CSAGO, corada com hematoxilina e eosina (HE). Observam-se estruturas sólidas de padrão papilífero, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica (setas).

O CSAGO apresenta uma variedade de sintomas que podem ser facilmente confundidos com outras doenças. Dentre eles, está a presença de massa abdominal, dor abdominal e pélvica, aumento da frequência urinária, aumento da distensão abdominal e, com a progressão da doença, pode ocorrer ascite, obstrução intestinal e de vias urinárias (EBELL et al. 2016).

Raramente CSAGO é detectado precocemente, o qual somente 25% das pacientes são diagnosticadas em estádios iniciais (EBELL et al. 2016). Além disso, o diagnóstico tardio dificulta o tratamento destas pacientes (JELOVAC e ARMSTRONG 2011).

O primeiro marcador estudado para detectar estes tumores foi o *cancer antigen 125* (CA125). Atualmente, este marcador, em combinação

com exames de imagem, como ultrassonografia e ressonância magnética, tem sido considerado o “padrão ouro” para a detecção e o acompanhamento da doença (HUANG et al. 2010).

Os níveis de CA125 estão elevados em aproximadamente 85% dos carcinomas serosos. A avaliação dos níveis desse marcador pode preceder uma detecção clínica, e é usado para o diagnóstico precoce e também como um valor clínico durante o tratamento (NOWAK et al. 2015). No entanto, o CA125 encontra-se normal em 20% dos casos de CSAGO e está elevado em algumas condições benignas, tais como cirrose e endometriose, diminuindo sua significância como biomarcador de detecção precoce da doença (SAROJINI et al. 2012).

O sistema de estadiamento clínico é adotado de acordo com o proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (PRAT 2015a). No estadio I, o tumor está confinado nos ovários ou nas tubas, além de poder haver células tumorais no lavado peritoneal e, no estadio II, o tumor é estendido para a cavidade pélvica (PRAT 2015a). O estadio III é definido como disseminação do tumor para a cavidade abdominal, comprometendo peritônio abdominal e linfonodos retroperitoneais, e cerca de 80% das pacientes são diagnosticadas neste estadio (PRAT 2015a). O estadio IV é caracterizado por metástases à distância, incluindo metástases nos parênquimas hepáticos/esplênicos e extra-abdominais (PRAT 2015a).

Em estadios mais avançados, CSAGO pode se disseminar para a cavidade abdominal através de vasos linfáticos e sanguíneos, que resultam

em comprometimento dos linfonodos e implantes (nódulos) na superfície peritoneal. Além disso, as células tumorais que atingem a corrente sanguínea podem causar metástases extra-abdominais, como fígado, pulmão e cérebro (ROMERO e BAST 2012).

Apesar de o diagnóstico precoce ser extremamente importante para o tratamento de CSAGO, ainda não existe um método acurado para detectar o tumor nos estádios iniciais e também auxiliar no acompanhamento do tratamento (SHAPIRA et al. 2014). Assim, novas moléculas têm sido descritas a fim de auxiliar na detecção precoce, como proteína do epidídimo humano 4 (HE4), haptoglobina e osteopontina. Entretanto, não são usadas na prática clínica, sendo necessários mais estudos para comprovar a eficácia dessas moléculas (NOWAK et al. 2015), além da busca de novos marcadores que contribuam para o acompanhamento do tratamento.

1.1.2 Tratamento do CSAGO

O tratamento para o câncer epitelial de ovário, em geral, se baseia em cirurgia, e a quimioterapia é indicada de acordo com o estadiamento da doença e grau de diferenciação (DESAI et al. 2014). O objetivo da cirurgia é diminuir o tamanho da massa tumoral, processo conhecido como citorredução, sem que haja lesão residual visível, considerada citorredução ótima (BOOKMAN 2016). A citorredução ótima tem um importante valor prognóstico em CSAGO, a qual melhora a sobrevida das pacientes (DESAI et al. 2014).

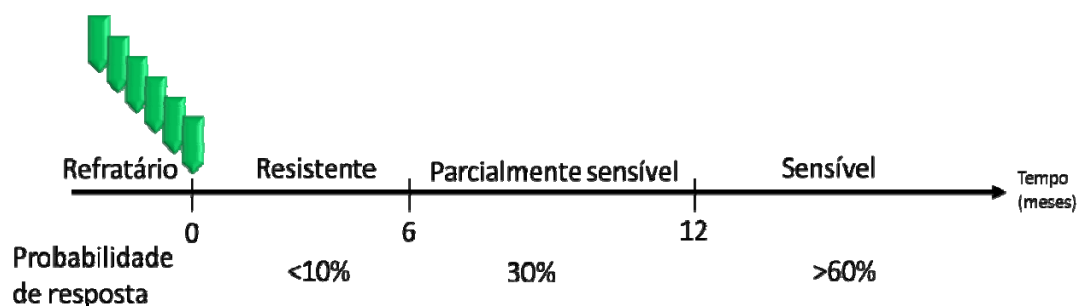
Para doença em estadios avançados (FIGO estadio III/IV), a forma padrão de tratamento é a citorredução primária seguida por quimioterapia baseada em platina, como cisplatina e carboplatina, combinada com taxanos, geralmente paclitaxel. Drogas do grupo das platinas apresentam um efeito citotóxico na célula, causando quebra da dupla fita de DNA e ativação da cascata de apoptose e morte celular. Muitos estudos tem relatado que pacientes portadoras de mutação no gene *BRCA* apresentam uma maior taxa de resposta a terapias baseadas em platina, uma vez que o gene *BRCA* está envolvido no reparo das lesões de dupla fita de DNA participando da via da recombinação homóloga, e pode diminuir o efeito danoso provocado por essas drogas (VENCKEN et al. 2011).

Apesar de, inicialmente, os CSAGOs apresentarem uma boa resposta a quimioterapia baseada em platina, cerca de 70% das pacientes recidivam, podendo apresentar resistência a essa droga (COLOMBO et al. 2014). Isso se deve a aquisição de alguns mecanismos que levam a limitação do efeito citotóxico na célula e evasão da morte celular resultante da ação da droga (GALLUZZI et al. 2012).

O comportamento clínico de resistência à platina é caracterizado de acordo com a resposta a partir do término do tratamento. O tratamento dura em média 21 semanas e consiste em seis ciclos de quimioterapia a cada três semanas. Aquelas pacientes que apresentam recidiva nos seis primeiros meses após o término completo da quimioterapia são consideradas resistentes à platina e menos de 10% destas pacientes respondem ao segundo tratamento com platina (COOKE e BRENTON

2011). Pacientes que recidivam entre seis a 12 meses após o término do tratamento são classificadas como parcialmente sensíveis, e, neste grupo, 30% das pacientes respondem ao segundo tratamento baseado em platina. Já aquelas pacientes que apresentam recidivas após 12 meses do término do tratamento, ou que não recidivam, são consideradas sensíveis à platina. Neste caso, mais de 60% delas respondem à reintrodução da platina. Raramente são observados casos em que há piora da doença menos de um mês após o término da quimioterapia inicial. Nestes casos a doença é considerada refratária à platina (COOKE e BRENTON 2011) (Figura 2).

6 ciclos de quimioterapia



Fonte: Adaptado de COOKE e BRENTON (2011).

Figura 2 - Classificação do comportamento clínico de resistência à platina de acordo com a resposta a partir do término da quimioterapia.

Pacientes resistentes geralmente recebem monoterapia como segunda linha de tratamento, sem administração de drogas baseadas em platina, devido à baixa taxa de resposta (COLOMBO et al. 2014). Drogas como paclitaxel administrada semanalmente (OSMAN et al. 2016), doxorrubicina lipossomal (GORDON et al. 2004), gencitabina (FERRANDINA

et al. 2008), topotecano (TEN BOKKEL HUININK et al. 1997) e inibidores da angiogênese, como o bevacizumabe (CANNISTRA et al. 2007), têm sido descritos como alternativas para o tratamento quimioterápico, uma vez que aumentam a sobrevida livre de doença das pacientes.

1.2 MECANISMO DE APOPTOSE E RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

A aquisição de resistência à quimioterapia baseada em platina tem se tornado um problema no tratamento dos carcinomas epiteliais de ovário, diminuindo a sobrevida das pacientes (LEDERMANN e KRISTELEIT 2010). Um dos mecanismos de resistência sugerido é a evasão da apoptose, processo resultante do efeito citotóxico da droga na célula (VENCKEN et al. 2011). Neste sentido, o microambiente tumoral exerce atividade importante, uma vez que fornece sinais de sobrevivência que estimulam a expressão de fatores anti-apoptóticos, inibindo, assim, a ação citotóxica da droga (YAACOUB et al. 2016).

Apoptose é um processo de morte celular programada importante na regulação do desenvolvimento e homeostase da célula normal. Entretanto, células tumorais perdem a capacidade de controlar o processo de apoptose, permitindo, dessa forma, uma maior sobrevivência da célula tumoral (HASSAN et al. 2014).

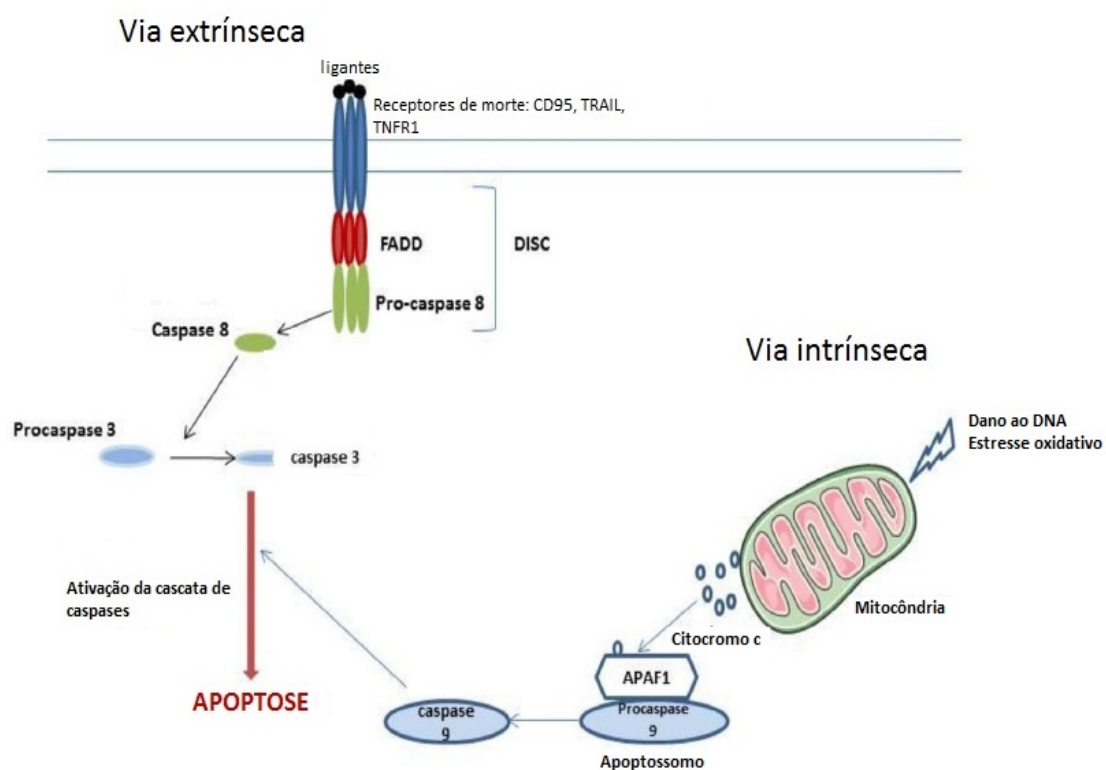
O controle molecular da apoptose ocorre através da ativação de duas vias bem estabelecidas, a via extrínseca e a via intrínseca. Ambas resultam

na ativação de caspases, moléculas proteolíticas que são sintetizadas na célula como precursores inativos, chamados de procaspases, e, quando ativadas, ativam as caspases efetoras. A ativação de caspases promove a cascata de sinalização da apoptose (YAACOUN et al. 2016).

A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte, como receptores Fas e receptores da família do fator de necrose tumoral (TNF). A ativação destes receptores recruta a proteína adaptadora FADD, que se associa com procaspase-8, formando o complexo de sinalização de indução de morte (DISC). Esse complexo é responsável por ativar as caspases efetoras, como caspase-3, -6 e -7, levando a morte celular (YAACOUN et al. 2016). Por outro lado, a via intrínseca é ativada por sinais intracelulares, como danos no DNA e estresse oxidativo, e é dependente da mitocôndria. Estes sinais induzem a liberação de várias proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria, como, por exemplo, citocromo c. Este se liga ao fator-1 de ativação da protease apoptótica (APAF1), e forma o apoptossomo, um complexo que ativa caspase-9 e -3 (YAACOUN et al. 2016) (Figura 3). A via intrínseca é regulada por proteínas da família células B de linfoma 2 (Bcl2), que consistem em proteínas pró-apoptóticas, como Bax, e proteínas anti-apoptóticas, como Bcl2 e Bcl-XL, que podem induzir ou inibir a liberação de proteínas apoptóticas, respectivamente (HASSAN et al. 2014).

Sinais de sobrevivência e alterações moleculares que resultam em aumento de expressão de proteínas anti-apoptóticas podem levar à evasão do processo de apoptose, e consequentemente resistência à agentes apoptóticos (HOLOHAN et al. 2013). Expressão elevada de Bcl2 e Bcl-XL

tem sido correlacionada com resistência à platina em tumores de ovário (YANG et al. 2004; WILLIAMS et al. 2005) e cabeça e pescoço (MICHAUD et al. 2009). Além disso, mutações em *TP53*, que exerce uma importante função na regulação do ciclo celular e está envolvido na indução da apoptose, estão frequentemente associada à resistência a drogas (HOLOHAN et al. 2013).



Fonte: Adaptado de YAACOUUB et al. (2016)

Figura 3 - Representação esquemática da via de apoptose. A ativação da via extrínseca é dependente de receptores de morte, que levam a formação do complexo DISC e ativação de caspase-8 e caspase-3. Na via intrínseca, condições de estresse permitem a liberação de citocromo c da mitocôndria, e, juntamente com APAF1, forma o complexo apoptossomo. Esse complexo ativa caspase-9, que desencadeia ativação da cascata de caspases.

Ao passo que alguns mecanismos de resistência à platina estão começando a ser compreendidos em CSAGO, como a participação do microambiente tumoral na evasão da apoptose (LOAR et al. 2010; KOTI et al. 2015), o conhecimento acerca de biomarcadores capazes de prever efetivamente resistência a essa droga ainda é limitado (WANG et al. 2014). Determinar esses marcadores poderia, além de ampliar os conhecimentos sobre a doença, direcionar as pacientes para o tratamento mais adequado.

1.3 POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA PREDIÇÃO DE RESPOSTA

1.3.1 Olfactomedina-4

A Olfactomedina-4 (OLFM4) pertence a um grupo de proteínas que exibem um domínio na parte C-terminal semelhante ao domínio da proteína olfactomedina. Esta proteína foi primeiramente encontrada na matriz extracelular do neuroepitélio olfatório, desempenhando um papel na quimiorrecepção (SNYDER et al. 1991; MORENO e BRONNER-FRASER 2001, 2005; TSUDA et al. 2002).

Originalmente, o gene *OLFM4* foi identificado e clonado em células precursoras da linhagem mieloide humanas, e mapeado no cromossomo 13q14.3. O gene consiste em cinco éxons abrangendo 23 kb, que variam seus tamanhos entre 156 a 801 pb, no qual seu RNA mensageiro codifica uma proteína contendo 510 aminoácidos (ZHANG et al. 2002).

Atualmente, sabe-se que esta proteína apresenta um padrão de expressão muito difundido e tecido-específico, como notado na próstata, estômago, intestino delgado, cólon e medula óssea, e desempenha inúmeras atividades biológicas (TOMAREV e NAKAYA 2009).

ZHANG et al. (2002) demonstraram que OLFM4 está presente nos estágios iniciais do desenvolvimento da linhagem mieloide, especificamente em células precursoras granulocíticas e concluíram que OLFM4 parece controlar o desenvolvimento dos granulócitos durante a diferenciação. Adicionalmente, LIU et al. (2006) identificaram a proteína OLFM4 na matriz extracelular, desempenhando papel na adesão célula-célula e célula-substrato, interagindo-se com lectina e caderina. Além disso, esta proteína parece ser também um marcador de células-tronco intestinais, pois apresenta uma intensa expressão em células-tronco multipotentes presentes na base das criptas do intestino delgado e cólon (VAN DER FLIER et al. 2009).

Outro papel importante de OLFM4 foi observado por ZHANG et al. (2004) que demonstraram que esta proteína está envolvida na regulação da apoptose. Além do processo de apoptose, outros mecanismos envolvidos com o desenvolvimento tumoral, como progressão do ciclo celular e proliferação, têm sido associados com a expressão de OLFM4 (KOBAYASHI et al. 2007; KOSHIDA et al. 2007).

Neste contexto, OLFM4 parece ser uma proteína presente em mecanismos comuns no desenvolvimento do tumor, tais como adesão celular, regulações do processo de apoptose e ciclo celular (Figura 4). O

aumento de expressão desta proteína tem sido relatado em diversos cânceres, tais como pâncreas (GRÜTZMANN et al. 2003), estômago (LIU et al. 2007; OUE et al. 2009; RAN et al. 2015), pulmão (SU et al. 2015), próstata (LI et al. 2013), cólon (LIU et al. 2008; VAN DER FLIER et al. 2009; SEKO et al. 2010), colo do útero (YU et al. 2011), adenocarcinoma endometrial (DUAN et al. 2014) e adenocarcinoma de ovário (MA et al. 2016). Geralmente, o aumento de expressão de OLFM4 estava associado a tumores bem diferenciados, estágios iniciais da doença e melhor prognóstico (LIU et al. 2007; LI et al. 2013; SU et al. 2015; MA et al. 2016).

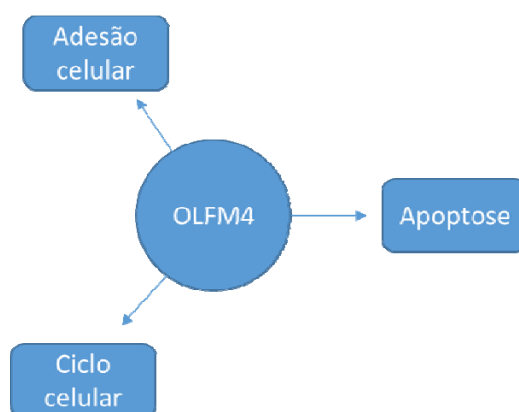


Figura 4 - OLFM4 desempenha papel em mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral.

Assim, OLFM4, uma glicoproteína secretada, tem surgido como um possível marcador para detecção e progressão tumoral (GUETTE et al. 2015). OUE et al. (2009) observaram que a concentração de OLFM4 no soro de pacientes em estágios iniciais de câncer gástrico foi significativamente maior quando comparado ao soro de indivíduos saudáveis. Resultados

similares têm sido observados em câncer colorretal (KARAGIANNIS et al. 2014).

A proteína OLFM4 pode ser potencial biomarcador em estágios iniciais de diversos tumores, e parece estar envolvida na progressão do tumor (GUETTE et al. 2015). Devido à sua atividade anti-apoptótica, OLFM4 pode conferir resistência à ação de drogas antitumorais (GROVER et al. 2010), e, neste contexto, mais estudos são necessários para melhor compreender a função de OLFM4 na resistência à quimioterapia.

1.3.2 Gene relacionado à mortalidade induzida por IFN- β /ácido retinóico (*GRIM-19*)

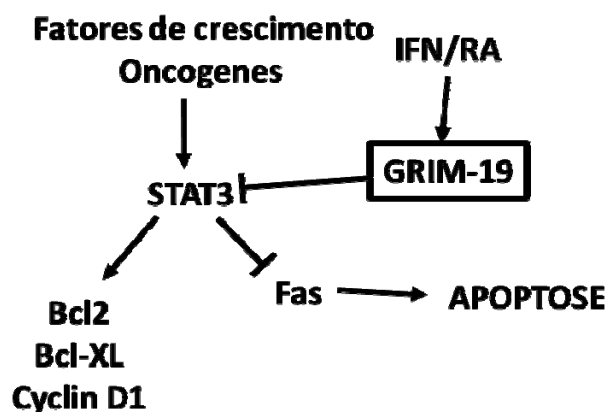
Interferons (IFNs) e ácido retinóico são descritos como moléculas que regulam o desenvolvimento tumoral e inibem o crescimento do tumor e angiogênese, potencializando a apoptose (BOOY et al. 2015; URAY et al. 2016). Além disso, drogas baseadas nestes compostos podem ser usadas no tratamento de vários cânceres (AASS et al. 2005; HUANG et al. 2007; SONG et al. 2014). ANGELL et al. (2000), com o objetivo de buscar genes associados à exposição a IFN- β /ácido retinóico, identificaram um gene associado à mortalidade induzida por IFN- β /ácido retinóico, GRIM-19, descrito como um novo fator apoptótico (KALVAKOLANU et al. 2010).

O gene que codifica GRIM-19 apresenta 13 kb e consiste em cinco éxons, mapeados no cromossomo 19p13.2 (CHIDAMBARAM et al. 2000). A proteína, de massa molecular de aproximadamente 16kDa, apresenta 144

aminoácidos, e pode estar expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma (ANGELL et al. 2000).

O envolvimento de GRIM-19 com a morte celular foi demonstrado em linhagem celular de carcinoma de mama, na qual a expressão tanto do RNA mensageiro quanto da proteína aumentaram na presença de IFN- β /ácido retinóico, e induziu apoptose nestas células, conferindo aumento de sensibilidade da célula à morte induzida por IFN- β /ácido retinóico. No entanto, a ausência de GRIM-19 confere crescimento e sobrevivência celular (ANGELL et al. 2000).

O mecanismo de ação da proteína GRIM-19 ocorre pela interação direta com o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), um fator de transcrição que está constitutivamente ativo em diversos cânceres e é responsável pela indução da expressão de vários oncogenes relacionados à apoptose, sobrevivência, proliferação e angiogênese (CHAI et al. 2016). Por meio dessa interação, GRIM-19 inibe a ação de STAT3 (LUFEL et al. 2003; ZHANG et al. 2003) (Figura 5).



Fonte: Adaptado de KALVAKOLANU (2004).

Figura 5 - Modelo de indução a morte celular por IFN/RA. Fatores de crescimento e oncogenes ativam STAT3 para suprimir a apoptose, através de indução de moléculas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bcl-XL) e reprimindo receptor de morte (Fas). IFN/RA aumenta expressão de GRIM-19, o qual interage com STAT3, inibindo sua função, e, consequentemente, promovendo apoptose.

Além de GRIM-19 apresentar função regulatória da apoptose, também está presente nas mitocôndrias, como um componente do complexo 1 da cadeia respiratória (HUANG et al. 2004, 2007; LU e CAO 2008). Assim, de acordo com os resultados de HUANG et al. (2004) a ausência de GRIM-19 leva a desmontagem do complexo 1 mitocondrial e interrupção da transferência de elétrons para a síntese de ATP.

Devido à interação com STAT3 e à ação apoptótica mediada por IFN- β /ácido retinóico, GRIM-19 tem sido destacada como uma nova proteína supressora de tumor, e estudos têm sido realizados a fim de compreender seu papel como um potencial alvo terapêutico (ZHANG et al. 2008; OKAMOTO et al. 2010). Entretanto, não há relatos na literatura associando expressão de GRIM-19 e resposta ao tratamento.

1.3.3 Fator nuclear kappa-beta (NFkB)

NFkB é uma importante família de fatores de transcrição envolvidos em vários processos celulares, como respostas imune e inflamatória, proliferação, diferenciação e apoptose (OECKINGHAUS e GHOSH 2009). Essa família foi descrita pela primeira vez por SEN e BALTIMORE (1986) como uma reguladora da cadeia leve *k* das moléculas de imunoglobulinas das células B. A partir disso, intensas pesquisas demonstraram que NFkB é expressa em praticamente todas as células, e é capaz de se ligar a regiões promotoras e regular um amplo número de genes (HAYDEN e GHOSH 2008).

A família NFkB é composta por cinco subunidades, p65, p52, p50, RelB e c-Rel, codificados respectivamente pelos genes *RELA*, *NFKB2*, *NFKB1*, *RELB* e *REL* (HAYDEN e GHOSH 2008). Os membros p50 e p52 são produzidos como proteínas precursoras, chamadas p105 e p100, respectivamente, e necessitam de atividade proteolítica para se tornarem ativos (MIYAMOTO 2011). Estas subunidades podem formar homo- e heterodímeros, sendo os mais comuns p65/p50 e RelB/p52, e todas elas compartilham um domínio de homologia Rel (RHD), responsável pela dimerização e pela ligação ao DNA (SHIH et al. 2011).

As proteínas p65, RelB e c-Rel apresentam em sua estrutura o domínio de ativação da transcrição (TAD), essencial para a regulação positiva da expressão gênica. Entretanto, p50 e p52 não apresentam esse domínio, e por isso podem reprimir a transcrição quando não estão associadas à p65, RelB ou c-Rel (HAYDEN e GHOSH 2008).

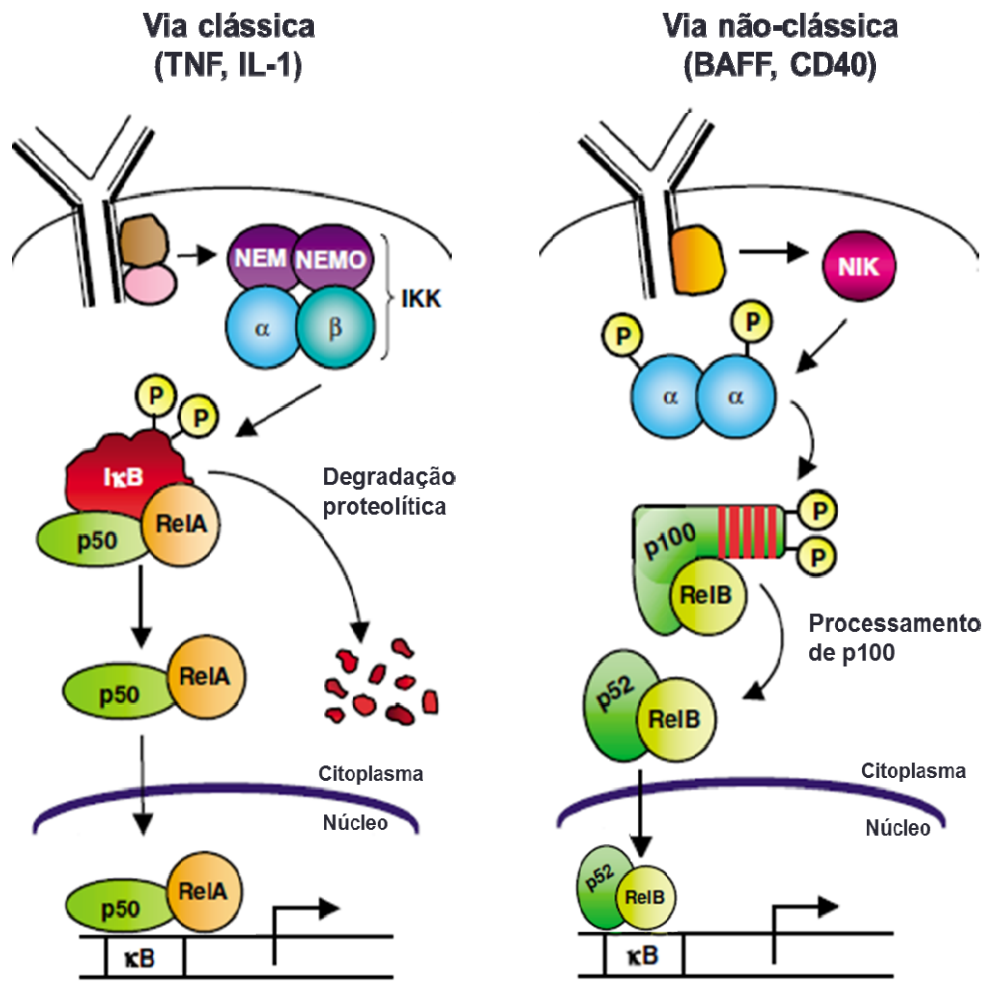
Em ausência de estímulo, os dímeros de NFkB estão presentes na forma inativa no citoplasma da célula, os quais estão associados a proteínas inibidoras de kB (IkbBs) e impedem a translocação dos dímeros para o núcleo. Os precursores p105 e p100 também são considerados inibidores, uma vez que exercem a mesma função das IkbBs (OECKINGHAUS e GHOSH 2009). O complexo IKK é responsável por liberar NFkB para o núcleo através da degradação de IkbBs e é composto por duas subunidades catalíticas, IKK α (IKK1) e IKK β (IKK2), e uma subunidade regulatória, a IKKy (NEMO) (OECKINGHAUS e GHOSH 2009).

Diversas vias de sinalizações desencadeadas por uma variedade de fatores de crescimento e citocinas são capazes de ativar a via de NFkB, como exemplo, as vias Ras/MAPK e PI3K/Akt, relacionadas a sobrevivência da célula (DOLCET et al. 2005). A ativação de NFkB requer a atividade do complexo de quinases de IkbBs (IKKs), e são controlados por duas vias de ativação: a via clássica e via não-clássica (SUN e LEY 2008)

Na via clássica, diversos estímulos, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), ativam IKK2, que fosforila IkbB, direcionando esta proteína para a degradação proteolítica. A degradação de IkbB libera o dímero NFkB, e este se desloca para o núcleo para regular a transcrição de genes alvo. O dímero mais bem estudado nesta via é p65/p50 (SKAUG et al. 2009). Já na via não clássica, a ativação de NFkB ocorre por meio de estímulos de subgrupos específicos de receptores TNF, como receptores BAFF e CD40, que ativam IKK1, mas não IKK2 e NEMO. Quando IKK1 está ativada, leva à fosforilação da subunidade p100 associada à RelB, que é

degradada por um complexo proteolítico e forma p52. O dímero p52/RelB se desloca para o núcleo para exercer atividade transcricional (MIYAMOTO 2011) (Figura 6).

NFkB atua na resposta imune inata e adaptativa, regulando a expressão de vários genes que codificam, por exemplo, citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , linfotoxinas e IFN γ) e moléculas de adesão. Além disso, exerce um papel no desenvolvimento de linfócitos T, por regular a expressão de IL-2 e aumentar a proliferação e diferenciação dessas células. A regulação da ativação de NFkB ainda pode ser controlada pela expressão de IL-1 e TNF α , resultando em um ciclo auto regulatório (LIANG et al. 2004).



Fonte: Adaptado de GILMORE (2006).

Figura 6 - Via clássica e não clássica de sinalização de NFκB. A via clássica é induzida por receptores de TNF e IL-1, que recrutam adaptadores de sinalização e ativam o complexo IKK, e este fosforila IκB, marcando-o para degradação por proteossomo, no citoplasma. Isso resulta na liberação do dímero p50/p65, que se desloca para o núcleo, onde induz a transcrição de genes alvo. A via não-clássica é induzida por receptores BAFF e CD40, que ativa NIK, a qual fosforila e ativa complexo IKK1 (IKKα). IKK1 ativada fosforila a subunidade p100, levando-a a um processamento proteolítico para p52. O dímero p52/RelB é liberado e se desloca para o núcleo, onde induz a transcrição de genes alvo.

Além de fatores inflamatórios, vários oncogenes são capazes de ativar a via de NFkB, como o oncogene *RAS*, que leva a uma proliferação celular anormal, e oncogene *BCR-ABL*, que induz a sobrevivência celular em leucemia mielóide crônica (LEE et al. 2007).

A ativação de NFkB estimula a expressão de genes que induzem a invasão celular (RANGASWAMI et al. 2004), a angiogênese (HUANG et al. 2000) e progressão do ciclo celular (PHAM et al. 2003). Além disso, exerce também um efeito anti-apoptótico em células tumorais, por levar a ativação de genes, como Bcl2, survivina e IAP, e, inibição de genes, como receptores de morte, Fas, TNF e caspase-1, que favorecem a apoptose (SHISHODIA e AGGARWAL 2002).

NFkB tem sido relacionada a resistência a diferentes compostos quimioterápicos e agentes ionizantes, uma vez que evita que a célula ative o processo de apoptose devido à danos causados por esses compostos (LEE et al. 2007). Isto tem sido descrito em recentes trabalhos, em especial, nos tumores de ovário que não respondem a terapia (WANG L et al. 2015; SHUANG et al. 2016). Em virtude de sua importante função, NFkB tem sido sugerido como um possível alvo para terapia de câncer (LEE et al. 2007). A inibição de IKKs e proteassomos tem sido descritos como estratégias para inibir a atividade de NFkB (LEE et al. 2007).

2 JUSTIFICATIVA

O CSAGO é o tumor ginecológico que aponta maior dificuldade de ser diagnosticado, e o que apresenta menor chance de cura, sendo responsável por 3% de todos os cânceres femininos (SIEGEL et al. 2016). Em estadios mais avançados, 70% das pacientes recidivam, e cerca de 10% destas adquirem resistência à platina, sendo necessária a alteração da estratégia terapêutica (COLOMBO et al. 2014).

Tendo em vista a necessidade de entender melhor mecanismos que tornam pacientes com CSAGO resistentes a quimioterapia, a busca por marcadores capazes de prever resistência ou sensibilidade é de suma importância, uma vez que, na prática clínica, não há o conhecimento sobre marcadores com essa finalidade. Tais marcadores poderiam direcionar para um tratamento mais adequado e eficaz dessas pacientes, uma vez que CSAGO é responsável por altas taxas de mortalidade.

Uma vez que estudos tem relacionado OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 no controle de ativação de caspase-3, uma molécula efetora da apoptose, e a evasão deste processo de apoptose pode levar a resistência a quimioterapia, estas proteínas podem ser potenciais marcadores de predição de resistência e sensibilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão proteica das proteínas OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 e sua associação com resposta a quimioterapia em pacientes com carcinoma seroso de ovário de alto grau.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar, através de imuno-histoquímica, a expressão protéica de OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 em diferentes grupos de pacientes com distintas respostas à quimioterapia;
- 2 Avaliar, através de imuno-histoquímica, a expressão protéica de OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 em tumores primários de carcinoma seroso de ovário de alto grau e suas recidivas, bem como em tumores serosos de baixo grau, *borderline* e tecidos normais;
- 3 Correlacionar a expressão de OLFM4, NFkB, GRIM-19 e IKK2 com a expressão de Caspase-3, fatores prognósticos bem estabelecidos em anatomia patológica, dados clínicos das pacientes e tempo de sobrevida.

4 MÉTODOS E CASUÍSTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C.Camargo Cancer Center, registrado sob o número 1863/14B (Anexo 1).

O desenho experimental está descrito na Figura 7.

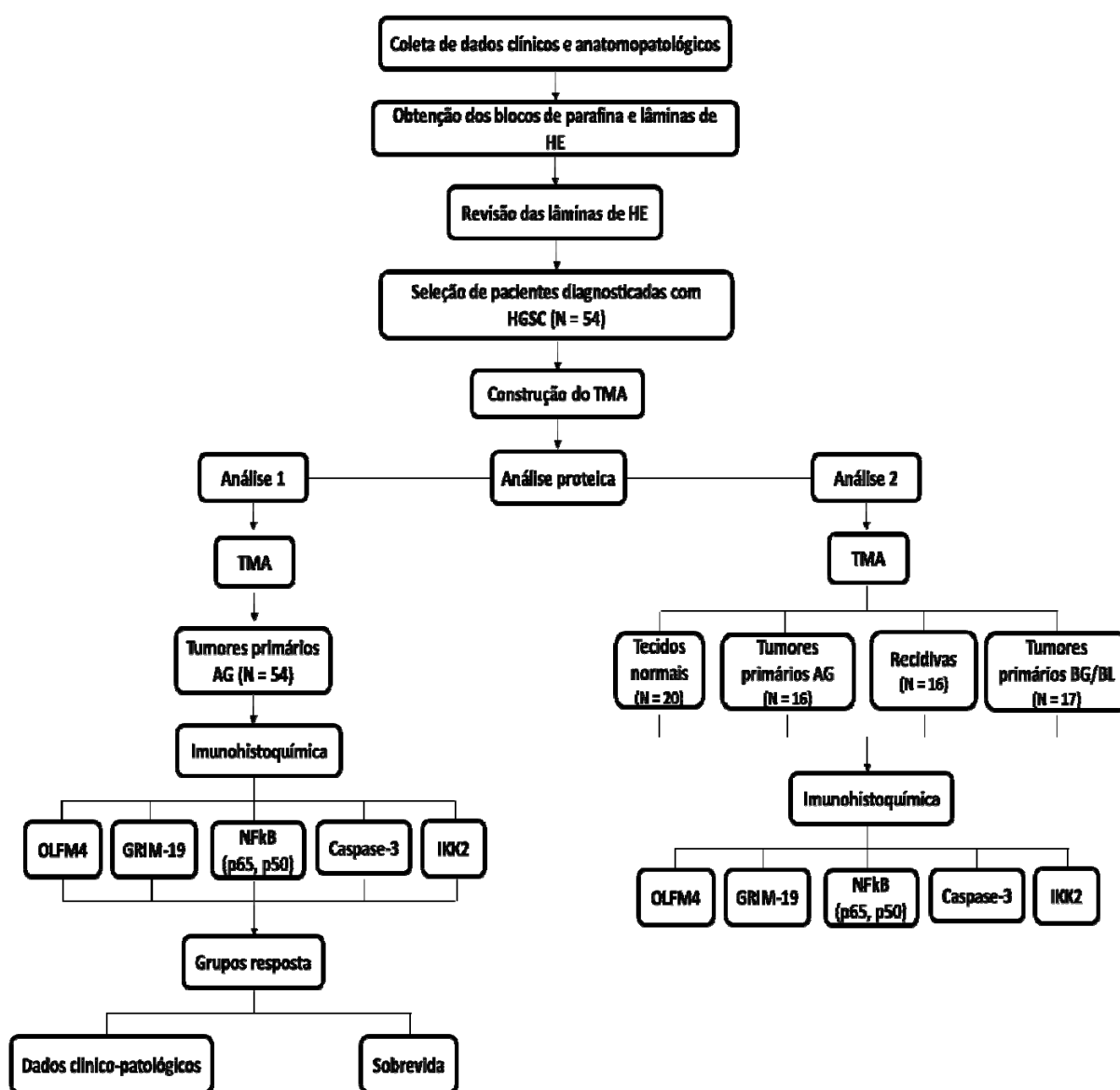


Figura 7 - Fluxograma de delineamento dos experimentos e análises.

4.1 COLETA DE DADOS

Toda a coleta de dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes foi realizada utilizando a ferramenta de busca de documentos de paciente H2TC disponível no sistema *online* do A.C.Camargo Cancer Center. As variáveis analisadas neste estudo foram:

- Idade ao diagnóstico;
- Data do diagnóstico;
- Data de cirurgia;
- Tipo de cirurgia;
- Tratamento quimioterápico;
- Data de início e fim da quimioterapia;
- Valores do marcador CA 125 pré-cirúrgico, pós-cirúrgico e de seguimento;
- Data de recidivas;
- Status no último seguimento;
- Data de óbito;
- Estadiamento FIGO;
- Tipo histológico;
- Invasões vascular e linfática;
- Acometimento linfonodal;
- Comprometimento da cápsula ovariana e da tuba uterina;
- Necrose; e
- Índice mitótico.

Todas as amostras de tecido utilizadas no estudo foram coletadas entre 2000 e 2013 e rotineiramente fixadas em formol 10% tamponado e incluídas em parafina. Este material foi obtido do arquivo da Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. As características anatomopatológicas dos casos utilizados foram revisadas e confirmadas por uma patologista especialista em ginecopatologia (Dra. Louise de Brot Andrade), por meio de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE). O índice mitótico foi determinado pela contagem do número de mitoses em 10 campos avaliados em maior aumento (40x).

Foram selecionadas neste estudo 54 pacientes que atenderam aos seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de adenocarcinoma seroso de alto grau de ovário, realização de cirurgia citorrredutora considerada ótima no A.C. Camargo Cancer Center, utilização de quimioterapia adjuvante baseada em platina e disponibilidade de material em bloco de parafina.

As pacientes deste estudo foram classificadas em resistentes, parcialmente sensíveis e sensíveis a fim de avaliar a expressão das proteínas em relação à taxa de resposta à platina. Os grupos parcialmente sensível e sensível foram agrupados, os quais, em relação ao grupo resistente, buscou-se avaliar a expressão proteica de acordo com resposta à platina (Figura 8).

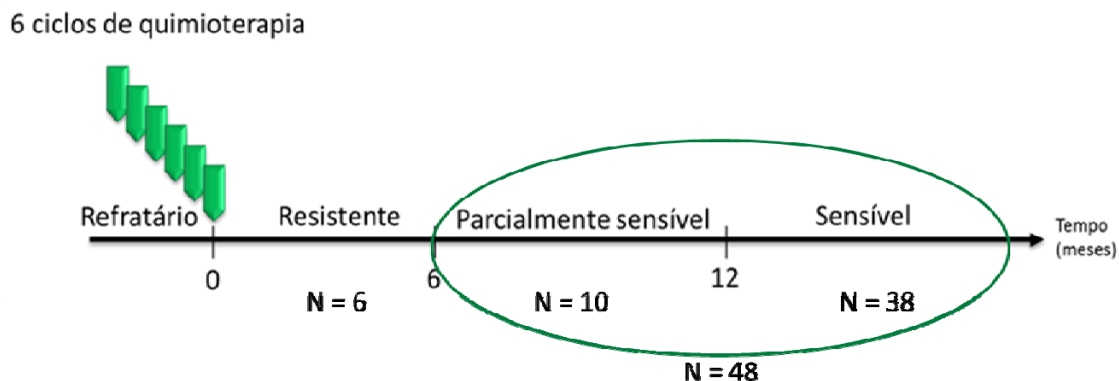


Figura 8 - Classificação das pacientes (N=54) de acordo com taxa de resposta a platina e resposta a quimioterapia.

4.2 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OLFM4, GRIM-19, NFKB-p65, NFKB-p50, IKK2 E CASPASE-3

4.2.1 Construção do *Tissue microarray* (TMA)

Para avaliar proteínas com potencial para biomarcador em carcinoma de seroso de alto grau, adotamos a estratégia de imuno-histoquímica em microarranjo de tecido (TMA). A construção da lâmina de TMA foi a partir de blocos de parafina de amostras de tumores primários de adenocarcinoma seroso de alto grau (TMA1), recidivas sensíveis (TMA2), recidivas resistentes (TMA3), e outras classificações histopatológicas (TMA4), com tumores primários serosos de baixo grau e *boderline*. Os tumores serosos de alto grau compreenderam tanto ovários comprometidos pela neoplasia quanto implantes abdominais e pélvicos.

As áreas tumorais foram selecionadas cuidadosamente por uma patologista (Dra. Louise de Brot Andrade) e as áreas representativas do tumor nas lâminas de HE foram demarcadas para transferência ordenada, e

em duplicata, do bloco de parafina original (doador) para um novo bloco de parafina (receptor), utilizando agulha de 1mm de diâmetro. O equipamento utilizado nesta técnica foi Manual Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, modelo MTA-I).

A construção do TMA foi realizada em colaboração com o Dr. Fernando Augusto Soares e Carlos Ferreira Nascimento, do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

4.2.2 Imuno-histoquímica

Foram realizados cortes de 4µm de espessura do bloco receptor utilizando um micrótomo (Leica®) e aderidos a lâminas carregadas positivamente (Superfrost Plus) e mantidos em estufa a 60°C. A recuperação antigênica por calor foi realizada em equipamento automatizado (BenchMark XT/LT – Ventana), utilizando-se o kit ultraView Universal DAB-Ventana, que consiste de um sistema de detecção biotina livre e, portanto, elimina a coloração não-específica resultante da biotina endógena. A peroxidase endógena foi bloqueada com reagente do mesmo fabricante por 5 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpo primário (Tabela 3), e posteriormente incubados com o anticorpo secundário. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film). As lâminas de IHQ foram digitalizadas no equipamento digitalizador de lâminas (APERIO®). Foi utilizada como controle negativo a ausência do anticorpo primário.

Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Controle positivo	Diluição
Anti-OLFM4	Novus Biologicals®	NBP2-24535	Fígado	1:150
Anti-GRIM-19	GeneTex®	EPR4471(2)	Rim	1:100
Anti-NFkB-p65	Abcam®	E379	Carcinoma de mama	1:250
Anti-NFkB-p105/p50	Abcam®	E381	Carcinoma de próstata	1:1000
Anti-IKK2	Biorbyt®	orb86857	Placenta	1:750
Anti-caspase-3	Cell Signaling Technology®	#9661	Linfonodo	1:300

4.2.3 Análise das proteínas e determinação do score

A leitura das lâminas de TMA, bem como os tecidos normais analisados, foi feita em microscópio ótico por um patologista, o qual não teve acesso aos dados clínicos das pacientes.

Os níveis de expressão citoplasmática de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3 foram representados pela porcentagem de células positivas e a intensidade de marcação, seguindo a fórmula $H\text{Score} = \Sigma(\text{porcentagem de células positivas} \times \text{intensidade de marcação})$. A porcentagem de células marcadas variou de 0 a 100%, e intensidade de marcação variou entre 0 (ausência de marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte), podendo classificar o HScore de 0 a 300 (ALVARENGA et al. 2013).

Para a avaliação da expressão nuclear de NFkB-p65, NFkB-p105/p50 e IKK2, foi empregado método adaptado para a análise, onde 10% de células marcadas ou ausência total de marcação, foi considerada 0 (negativo); 11% a 49% de células marcadas, considerada 1 (marcação

irregular); e acima de 50% de células marcadas, considerada 2 (marcação difusa). As categorias 1 e 2 foram consideradas positivas para expressão desses marcadores (SEO et al. 2009).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi usado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), para *Windows*, versão 22.0, e o programa R, versão 3.2.4. Os gráficos foram feitos através do programa GraphPad Prism, versão 5.01.

O teste de Qui-Quadrado e o teste Exato de Fisher foram usados para verificar a associação entre variáveis categóricas (expressão proteica de NFkB-p65, NFkB-p105/p50, IKK2 e dados clínico-patológicos). Para verificar a associação entre variáveis numéricas (expressão proteica de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3) e variáveis categóricas (dados clínico-patológicos e expressão proteica de NFkB-p65, NFkB-p105/p50, IKK2), foi usado o teste de Mann-Whitney. O teste de correlação de Spearman foi usado para verificar correlação entre variáveis numéricas (expressão proteica de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3).

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

A determinação do efeito independente de um fator patológico, molecular e clínico foi realizada através da análise multivariada utilizando modelo regressão de Cox e modelo de regressão logística múltipla.

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

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A Tabela 3 apresenta características clínico-patológicas da amostra estudada. Esta amostra foi composta por mulheres com média de idade de 55,89 anos ($\pm 10,787$). Destas, 48 (88,9%) pacientes foram diagnosticadas em estadios avançados da doença (III-IV). Dos 54 tumores analisados, 45 (83,3%) foram localizados no ovário e nove (16,7%) foram implantes. Em relação à classificação dos grupos de resposta à platina, apenas 6/54 (11,1%) foram resistentes e 48/54 (88,9%) foram consideradas sensíveis à platina após seis meses do término da quimioterapia. Foi observado, também, que 29/45 (64,4%) apresentaram invasão vascular linfática e que 42/45 (93,3%) exibiram comprometimento da superfície ovariana. As pacientes resistentes à platina apresentaram pior sobrevida global quando comparadas às pacientes parcialmente sensíveis e sensíveis após 12 meses ($p < 0,001$) (Figura 9). Os demais dados clínico-patológicos não apresentaram associação com sobrevida.

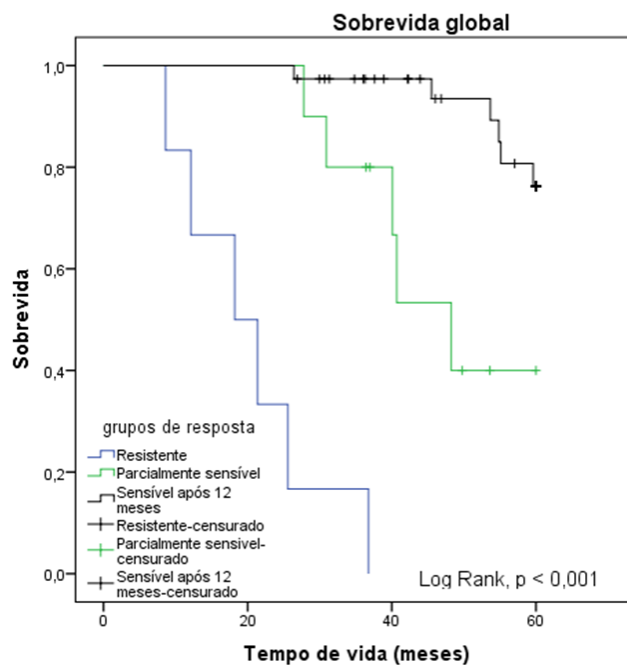


Figura 9 - Curva de sobrevida global de pacientes resistentes, parcialmente sensíveis e sensíveis à platina.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas das pacientes com adenocarcinoma seroso de alto grau (N=54).

Variáveis clínico-patológicas	Categoria	n/Total(%)
Idade (anos), média (série)	55,89 (33-76)	-
Desvio-padrão	±10,787	
Estadiamento	I – II	6/54 (11,1)
	III – IV	48/54 (88,9)
Grupo resposta	Resistente	6/54 (11,1)
	Parcialmente sensível	10/54 (18,5)
	Sensível (após 12 meses)	38/54 (70,4)
	Sensível (após seis meses)	48/54 (88,9)
Seguimento (meses), média (série)	64,5 (27-110)	-
Óbito	Sim	17/54 (31,5)
	Não	37/54 (68,5)
Recidiva	Sim	39/54 (72,2)
	Não	15/54 (27,8)
Localização do tumor	Ovário	45/54 (83,3)
	Implantes	9/54 (16,7)
Acometimento bilateral	Sim	31/45 (68,9)
	Não	14/45 (31,1)
Invasão vascular linfática	Sim	29/45 (64,4)
	Não	16/45 (35,6)
Invasão vascular sanguínea	Sim	7/45 (15,6)
	Não	38/45 (84,4)
Necrose	Ausente	5/45 (11,1)
	Focal	16/45 (35,6)
	Extensa	24/45 (53,3)
Comprometimento da superfície ovariana	Sim	42/45 (93,3)
	Não	3/45 (6,7)
Comprometimento da tuba uterina	Sim	31/45 (68,9)
	Não	14/45 (31,1)
Metástase linfonodal	Sim	27/48 (56,3)
	Não	21/48 (43,8)
Índice mitótico, mediana (quartil1-quartil3)	26 (21-33)	-

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OLFM4, GRIM-19, NFKB-p65, NFKB-p50, IKK2 E CASPASE-3

5.2.1 Expressão de OLFM4

A expressão de OLFM4 apresentou um padrão de marcação citoplasmática nítida e bem localizada (Figuras 10A e B). A positividade para OLFM4 foi observada no grupo resistente em 6/6 (100%), no grupo parcialmente sensível em 9/10 (90%), no grupo sensível após 12 meses em 32/38 (84,2%) e no grupo sensível após seis meses em 41/48 (85,4%) dos casos. Já para as histologias, a positividade para OLFM4 foi observada no tecido normal em 20/20 (100%), nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* em 16/16 (100%), nos tumores serosos de alto grau em 13/16 (81,2%) e nas recidivas dos tumores serosos de alto grau em 16/16 (100%).

Os maiores níveis de expressão para a proteína foram significativamente associados com comprometimento da superfície ovariana ($p = 0,047$; Tabela 4). Por outro lado, não houve associação significativa entre OLFM4 e estadiamento, localização do tumor, invasão vascular sanguínea e linfática, necrose, metástase linfonodal, comprometimento da tuba uterina (Tabela 4), sobrevida global (Figura 10F) e livre de doença (Figura 10G). Além disso, não foi notada diferença de expressão de OLFM4 entre os grupos de resposta à platina (Figura 10C e D), bem como entre tumores primários de alto e baixo grau e *borderline*, recidivas e tecidos normais (Figura 10E).

5.2.2 Expressão de GRIM-19

A expressão de GRIM-19 exibiu um padrão de marcação citoplasmática, com característica granular e bem localizada (Figuras 11A e B). A positividade para GRIM-19 foi observada no grupo resistente em 3/6 (50%), no grupo parcialmente sensível em 7/10 (70%), no grupo sensível após 12 meses em 28/38 (73,6%) e no grupo sensível após seis meses em 35/48 (72,9%) dos casos. Já para as histologias, a positividade para GRIM-19 foi observada no tecido normal em 11/18 (61,1%), nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* em 16/16 (100%), nos tumores serosos de alto grau em 9/16 (56,2%) e nas recidivas dos tumores serosos de alto grau em 8/16 (50%).

Não houve diferença significativa entre a expressão da proteína e variáveis clínico-patológicas (Tabela 4), bem como entre os grupos de resposta à platina (Figura 11C e D) e sobrevida global (Figura 11F). Os níveis de expressão de GRIM-19 observados em tumores serosos de baixo grau e *borderline* foram significativamente maiores quando comparados com tecido normal, tumores serosos de alto grau e recidivas dos tumores de alto grau ($p = 0,011$; Figura 11E). Ainda, pacientes com maior expressão de GRIM-19 apresentaram uma maior probabilidade de sobrevida livre de doença ($p = 0,028$; Figura 11G). Quanto à análise multivariada, o aumento de expressão de GRIM-19 foi independentemente associado com melhor taxa de sobrevida livre de doença ($p = 0,016$; Tabela 8).

5.2.3 Expressão de NFkB-p65

A expressão de NFkB-p65 exibiu um perfil de marcação homogênea tanto no citoplasma quanto no núcleo (Figura 12A e B). A positividade para NFkB-p65 foi observada no grupo resistente em 4/6 (66,6%), no grupo parcialmente sensível em 6/10 (60%), no grupo sensível após 12 meses em 12/38 (31,5%) e no grupo sensível após seis meses em 18/48 (37,5%) dos casos. Para outras histologias, a positividade da proteína foi observada no tecido normal em 17/18 (94,4%), nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* em 1/15 (6,6%), nos tumores serosos de alto grau em 8/17 (47,1%) e nas recidivas dos tumores serosos de alto grau em 5/16 (31,2%).

Não houve associação significativa entre a positividade da proteína, dados clínico-patológicos (Tabela 5) e sobrevida livre de doença (Figura 12G). Ainda, não houve diferença entre positividade nuclear de NFkB-p65 e grupos de resposta à platina (Figura 12C e D). Entretanto, a positividade da proteína nos tecidos normais foi significativamente maior quando comparada aos tumores serosos de baixo grau e *borderline*, tumores serosos de alto grau e recidivas dos tumores serosos de alto grau ($p < 0,001$; Figura 12E). Além disso, positividade de NFkB-p65 foi associada a menor taxa de sobrevida global ($p = 0,001$; Figura 12F). O modelo de Cox mostrou que a positividade desta proteína foi independentemente associada a pior probabilidade de sobrevida global ($p = 0,006$, Tabela 7).

5.2.4 Expressão de NFkB-p50

A expressão de NFkB-p50 apresentou um padrão de marcação citoplasmática e nuclear, bem localizada e homogênea (Figura 13A e B). A positividade nuclear de NFkB-p50 foi observada no grupo resistente em 2/6 (33,3%), no grupo parcialmente sensível em 5/10 (50%), no grupo sensível após 12 meses em 21/38 (55,2%) e no grupo sensível após seis meses em 26/48 (54,1%) dos casos. Para outras classificações anatomopatológicas, a positividade da proteína foi observada no tecido normal em 18/18 (100%), nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* em 8/15 (53,3%), nos tumores serosos de alto grau em 7/17 (41,1%) e nas recidivas dos tumores serosos de alto grau em 9/15 (60%).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade de NFkB-p50, dados clínico-patológicos (Tabela 5), os grupos de resposta à platina (Figuras 13C e D) e sobrevidas global (Figura 13F) e livre de doença (Figura 13G). Em contraste, a positividade desta proteína esteve significativamente presente nos tecidos normais quando comparadas aos tumores serosos de baixo grau e *borderline*, tumores serosos de alto grau e recidivas dos tumores serosos de alto grau ($p < 0,001$; Figura 13E).

5.2.5 Expressão de IKK2

A expressão de IKK2 apresentou um perfil de marcação citoplasmática e nuclear, bem localizada e homogênea (Figura 14A e B). A positividade nuclear de IKK2 foi observada no grupo resistente em 4/6 (66,6%), no grupo parcialmente sensível em 5/10 (50%), no grupo sensível

após 12 meses em 8/37 (21,6%) e no grupo sensível após seis meses em 13/47 (27,6%) dos casos. Para outras histologias, a positividade da proteína foi observada no tecido normal em 18/18 (100%), nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* em 12/16 (75%), nos tumores serosos de alto grau em 5/16 (31,2%) e nas recidivas dos tumores serosos de alto grau em 14/16 (87,5%).

A positividade de IKK2 esteve significativamente presente nos implantes quando comparado com o ovário ($p = 0,03$; Tabela 5), e aumentou a chance de causar implantes peritoneais, de acordo com o modelo de regressão logística múltipla (Tabela 6). Similarmente, IKK2 esteve presente prevalentemente no grupo resistente quando comparado com os grupos parcialmente sensível e sensível após 12 meses ($p = 0,04$; Figura 14C). A proteína IKK2 apresentou uma menor expressão nos tumores serosos de alto grau, quando comparados aos tecidos normais, tumores serosos de baixo grau e *borderline* e recidivas dos tumores primários ($p < 0,001$; Figura 14E). Pacientes com presença de IKK2 apresentaram uma menor probabilidade de sobrevida livre de doença ($p = 0,041$; Figura 14G). Adicionalmente, o modelo de Cox mostrou que a positividade desta proteína foi independentemente associada a pior taxa de sobrevida livre de doença ($p = 0,026$; Tabela 8).

5.2.6 Expressão de Caspase-3

A expressão de Caspase-3 apresentou um perfil de marcação citoplasmática, bem localizada e focal (Figuras 15A e B). A positividade

citoplasmática de Caspase-3 foi observada no grupo resistente em 3/6 (50%), no grupo parcialmente sensível em 4/10 (40%), no grupo sensível após 12 meses em 17/35 (48,6%) e no grupo sensível após 12 meses em 21/45 (46,7%) dos casos. Já para os tecidos tumorais, a positividade para Caspase-3 foi observada nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* em 2/15 (13,3%), nos tumores serosos de alto grau em 7/17 (41,1%) e nas recidivas dos tumores serosos de alto grau em 5/13 (38,5%).

Não houve diferença significativa de expressão de Caspase-3 entre os parâmetros clínico-patológicos (Tabela 4), os grupos de resposta a platina (Figuras 15C e D) e entre os tumores serosos e as recidivas (Figura 15E). Também não houve associação significativa com sobrevida global e livre de doença (Figuras 15F e G).

Tabela 4 - Expressão de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3 e dados clínico-patológicos (N = 54).

Expressão proteica	Variáveis	Categoria	n(%)	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p
OLFM4	Estadiamento	I – II	6 (11,5)	198,33 (4,1)	200 (190-200)	0,572
		III – IV	46 (88,5)	194,35 (20,61)	200 (100-210)	
	Localização do tumor	Ovário	44 (84,6)	193,86 (21,1)	200 (100-210)	0,644
		Implante	8 (15,4)	200 (0)	200 (200-200)	
	Acometimento bilateral	Sim	30 (68,2)	194,67 (20,63)	200 (100-210)	0,929
		Não	14 (31,8)	192,14 (22,6)	200 (130-210)	
	Invasão vascular linfática	Sim	28 (63,6)	195 (21,17)	200 (100-210)	0,522
		Não	16 (36,4)	191,88 (21,36)	200 (130-210)	
	Invasão vascular sanguínea	Sim	7 (15,9)	202,86 (4,88)	200 (200-210)	0,125
		Não	37 (84,1)	192,16 (22,5)	200 (100-210)	
	Necrose	Ausente	5 (11,4)	190 (22,36)	200 (150-200)	0,632
		Focal	15 (34,1)	199,33 (7,1)	200 (180-210)	
		Extensa	24 (54,5)	191,25 (26,1)	200 (100-210)	
	Comprometimento da superfície ovariana	Sim	41 (93,2)	192,51 (21,5)	200 (100-210)	0,047*
		Não	3 (6,8)	206,67 (5,77)	210 (200-210)	
	Metástase linfonodal	Sim	27 (58,7)	194,81 (19,1)	200 (130-210)	0,266
		Não	19 (41,3)	193,16 (23,1)	200 (100-200)	
	Comprometimento da tuba uterina	Sim	31 (70,5)	193,23 (21,66)	200 (100-210)	0,523
		Não	13 (29,5)	195,38 (20,22)	200 (130-210)	
GRIM-19	Estadiamento	I – II	6 (11,1)	191,67 (20,41)	200 (150-200)	0,484
		III – IV	48 (88,9)	183,33 (33,28)	200 (100-200)	
	Localização do tumor	Ovário	45 (83,3)	186,44 (30,1)	200 (100-200)	0,281
		Implante	9 (16,6)	173,33 (40,1)	200 (100-200)	
	Acometimento bilateral	Sim	31 (68,8)	183,55 (34,4)	200 (100-200)	0,912
		Não	14 (31,2)	192,86 (16,37)	200 (140-200)	
	Invasão vascular linfática	Sim	29 (64,4)	182,76 (35,34)	200 (100-200)	0,406
		Não	16 (35,6)	193,67 (15,8)	200 (140-200)	
	Invasão vascular sanguínea	Sim	7 (15,6)	180 (36,96)	200 (100-200)	0,156
		Não	38 (84,4)	187,63 (29,1)	200 (100-200)	
	Necrose	Ausente	5 (11,1)	184 (26,1)	200 (140-200)	0,326
		Focal	16 (35,6)	181,88 (34,5)	200 (100-200)	
		Extensa	24 (53,3)	190 (28,43)	200 (100-200)	
	Comprometimento da superfície ovariana	Sim	42 (93,3)	185,53 (30,93)	200 (100-200)	0,289
		Não	3 (6,7)	200 (0)	200 (100-200)	
	Metástase linfonodal	Sim	27 (58,7)	194,81 (19,1)	200 (130-210)	1,000
		Não	19 (41,3)	193,16 (23,1)	200 (100-200)	
	Comprometimento da tuba uterina	Sim	31 (70,5)	193,23 (21,66)	200 (100-200)	0,175
		Não	13 (29,5)	195,38 (20,25)	200 (130-200)	

Cont/ Tabela 4

Expressão proteica	Variáveis	Categoria	n(%)	Média (DP)	Mediana (min-máx)	Valor de p
Caspase-3	Estadiamento	I – II	6 (11,8)	5,33 (8,16)	1 (0-20)	0,898
		III – IV	45 (88,2)	5,53 (13,02)	1 (0-80)	
	Localização do tumor	Ovário	42 (82,3)	4,17 (6,96)	0,5 (0-30)	0,688
		Implante	9 (17,7)	11,78 (25,92)	1 (0-80)	
	Acometimento bilateral	Sim	29 (69)	3,83 (6,77)	1 (0-30)	0,979
		Não	13 (31)	4,92 (7,6)	0 (0-20)	
	Invasão vascular linfática	Sim	28 (66,7)	4,39 (7,03)	1,5 (0-30)	0,683
		Não	14 (33,3)	3,71 (7,06)	0 (0-20)	
	Invasão vascular sanguínea	Sim	7 (16,7)	6,14 (11,11)	1 (0-30)	0,792
		Não	35 (83,3)	3,77 (5,97)	0 (0-20)	
	Necrose	Ausente	5 (11,9)	4 (8,94)	0 (0-20)	0,610
		Focal	16 (38,1)	4,12 (6,2)	2 (0-20)	
		Extensa	21 (50)	4,24 (7,38)	1 (0-30)	
	Comprometimento da superfície ovariana	Sim	39 (92,8)	3,92 (6,71)	0 (0-30)	0,545
		Não	3 (7,2)	7,33 (11,01)	2 (0-20)	
	Metástase linfonodal	Sim	24 (53,3)	2,54 (4,96)	0 (0-20)	0,082
		Não	21 (46,7)	6,1 (8,17)	2 (0-30)	
	Comprometimento da tuba uterina	Sim	29 (69)	4,66 (7,48)	0 (0-30)	0,893
		Não	13 (31)	3,08 (5,75)	2 (0-20)	

*Teste Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

Tabela 5 - Expressão de NFkB-p65, NFkB-p50/105 e IKK2 e dados clinico-patológicos (N = 54).

Expressão proteica	Variáveis	Categoria	Positividade/Total (%)	Valor de p
NFκB-p65	Estadiamento	I – II	1/6 (16,7)	0,383
		III – IV	21/48 (43,8)	
	Localização do tumor	Ovário	17/45 (37,8)	0,461
		Implante	5/9 (55,6)	
	Acometimento bilateral	Sim	12/31 (38,7)	0,848
		Não	5/14 (35,7)	
	Invasão vascular linfática	Sim	13/29 (44,8)	0,186
		Não	4/16 (25)	
	Invasão vascular sanguínea	Sim	4/7 (57,1)	0,399
		Não	13/38 (34,2)	
NFκB-p50	Necrose	Ausente	3/5 (60)	0,333
		Focal	7/16 (43,8)	
		Extensa	7/24 (29,2)	
	Comprometimento da superfície ovariana	Sim	16/42 (38,1)	0,903
		Não	1/3 (33,3)	
	Metástase linfonodal	Sim	12/27 (44,4)	0,658
		Não	8/21 (38,1)	
	Comprometimento da tuba uterina	Sim	14/31 (45,2)	0,188
		Não	3/14 (21,4)	
	NFκB-p50	Estadiamento	I – II	5/6 (83,3)
III – IV			23/48 (47,9)	
Localização do tumor		Ovário	24/45 (53,3)	0,724
		Implante	4/9 (44,4)	
Acometimento bilateral		Sim	16/31 (51,6)	0,731
		Não	8/14 (57,1)	
Invasão vascular linfática		Sim	14/29 (48,3)	0,396
		Não	10/16 (62,5)	
Invasão vascular sanguínea		Sim	5/7 (71,4)	0,422
		Não	19/38 (50)	
NFκB-p50	Necrose	Ausente	4/5 (80)	0,193
		Focal	6/16 (37,5)	
		Extensa	14/24 (58,3)	
	Comprometimento da superfície ovariana	Sim	22/42 (52,4)	1,000
		Não	2/3 (66,7)	
	Metástase linfonodal	Sim	14/27 (51,9)	0,715
		Não	12/21 (57,1)	
	Comprometimento da tuba uterina	Sim	18/31 (58,1)	0,344
		Não	6/14 (42,9)	
	IKK2	Estadiamento	I – II	1/6 (16,7)
III – IV			16/47 (34)	
Localização do tumor		Ovário	10/44 (22,7)	0,003*
		Implante	7/9 (77,8)	
Acometimento bilateral		Sim	5/30 (16,7)	0,160
		Não	5/14 (35,7)	
Invasão vascular linfática		Sim	5/28 (17,9)	0,280
		Não	5/16 (31,3)	
Invasão vascular sanguínea		Sim	0/7 (0)	0,308
		Não	10/37 (27)	
IKK2	Necrose	Ausente	3/5 (60)	0,099
		Focal	3/15 (20)	
		Extensa	4/24 (16,7)	
	Comprometimento da superfície ovariana	Sim	9/41 (22)	1,000
		Não	1/3 (33,3)	
	Metástase linfonodal	Sim	4/27 (14,8)	0,165
		Não	7/20 (35)	
	Comprometimento da tuba uterina	Sim	6/31 (19,4)	0,449
		Não	4/13 (30,8)	

*Teste Qui-quadrado/Teste exato de Fisher. Nível de significância $p \leq 0,05$.

Tabela 6 - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão logística múltipla para variável dependente de localização do tumor (implante).

Variável	Categoria	Localização do tumor		OR	IC (95%) OR	Valor de p
		Ovário (%)	Implante (%)			
IKK2	Positivo	10/44 (22,7)	7/9 (77,8)	30,51	2,54-365,9	0,007
	Negativo	34/44 (77,3)	2/9 (22,2)			

* Variáveis independentes: IKK2, GRIM-19 e NFkB-p65. OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança. Nível de significância $p \leq 0,05$.

Tabela 7- Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão de Cox para evento de interesse óbito.

Variável	HR	IC (95%) HR	Valor de p
NFkB-p65	4,291	1,529; 12,039	0,006

* Variáveis independentes: NFkB-p65, IKK2, GRIM-19 e OLFM4. HR = Hazard Ratio; IC = Intervalo de Confiança. Nível de significância $p \leq 0,05$.

Tabela 8 - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox para evento de interesse recidiva.

Variável	HR	IC (95%) HR	Valor de p
IKK2	2,240	1,103; 4,552	0,026
GRIM-19	0,320	0,127; 0,806	0,016

* Variáveis independentes: NFkB-p65, IKK2, GRIM-19 e OLFM4. HR = Hazard Ratio; IC = Intervalo de Confiança. Nível de significância $p \leq 0,05$.

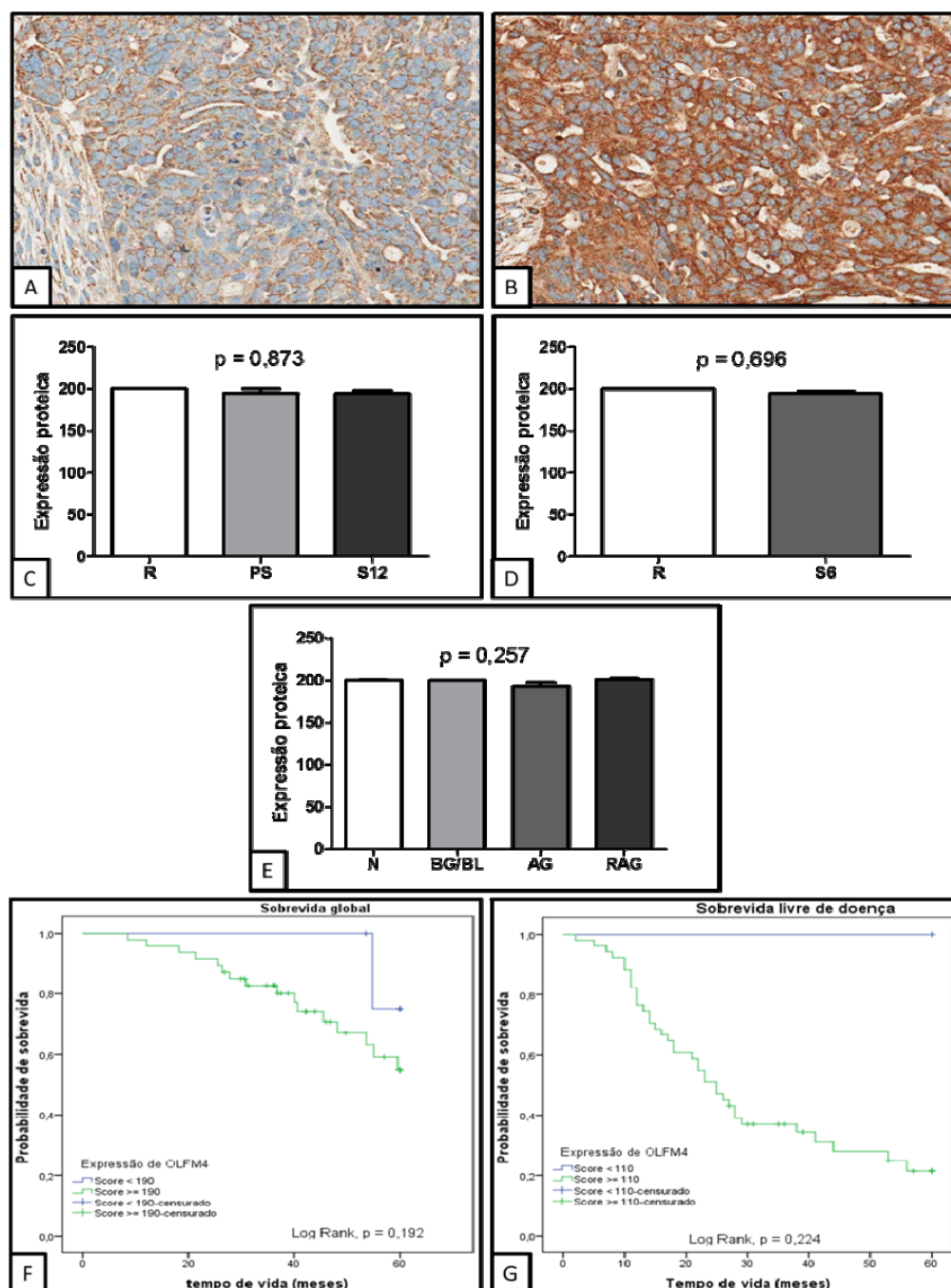


Figura 10 - Expressão de OLFM4. Representação imuno-histoquímica de expressão fraca (A) e forte (B); Comparação dos níveis de expressão proteica entre grupos de resposta à platina (C e D) e entre tecido normal e tecidos tumorais (E); Curvas de sobrevida global (F) e livre de doença (G). R = resistente; PS = parcialmente sensível; S12 = sensível após 12 meses; S6 = sensível após 6 meses; N = tecido normal; BG/BL = tumor primário seroso de baixo grau e borderline; AG = tumor primário seroso de alto grau; RAG = recidiva do tumor primário de alto grau.

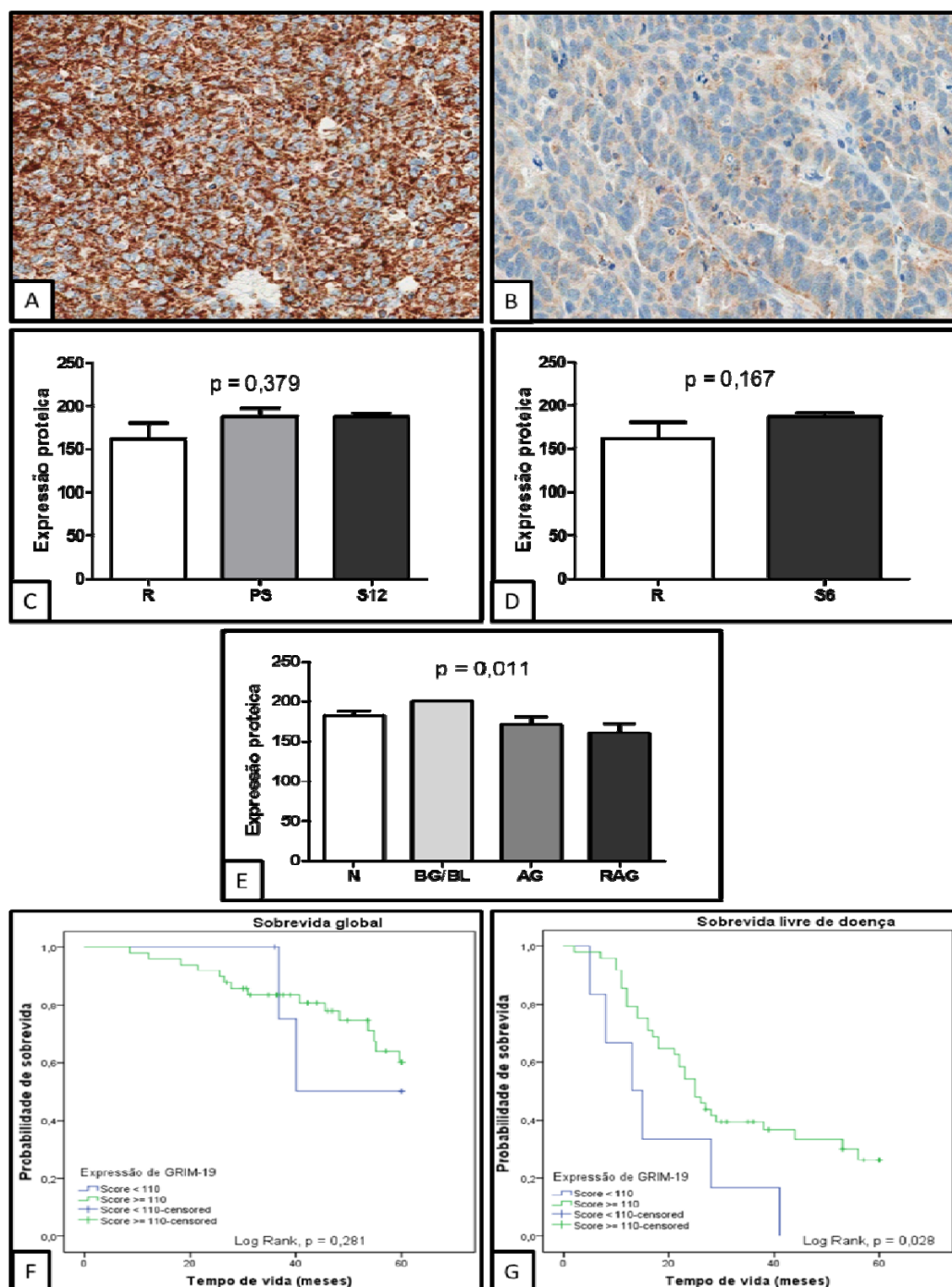


Figura 8 - Expressão de GRIM-19. Representação imuno-histoquímica de expressão forte (A) e fraca (B); Comparação dos níveis expressão proteica entre grupos de resposta à platina (C e D) e entre tecido normal e tecidos tumorais (E); Curvas de sobrevivência global (F) e livre de doença (G). R = resistente; PS = parcialmente sensível; S12 = sensível após 12 meses; S6 = sensível após 6 meses; N = tecido normal; BG/BL = tumor primário seroso de baixo grau e *borderline*; AG = tumor primário seroso de alto grau; RAG = recidiva do tumor primário de alto grau.

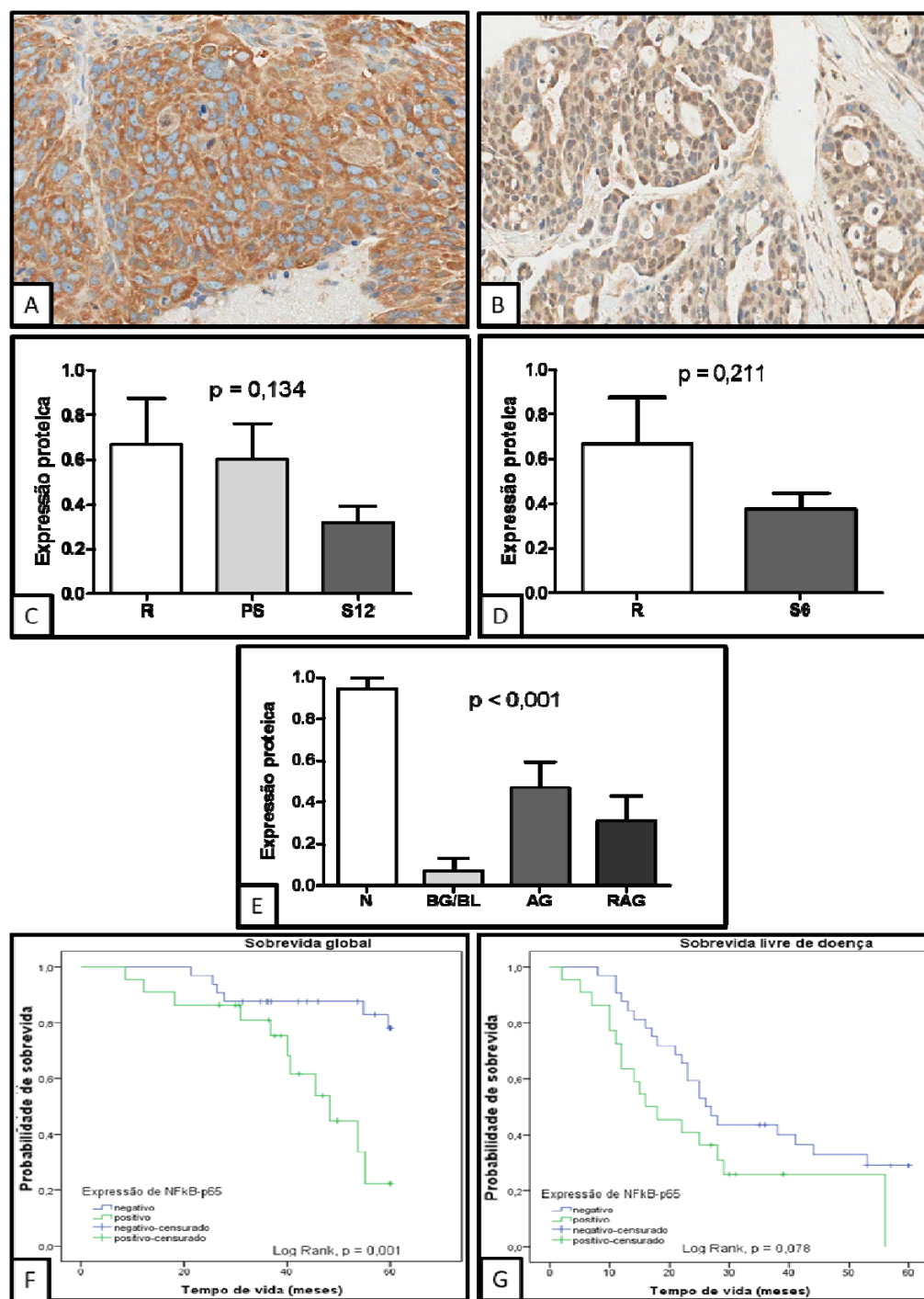


Figura 9 - Expressão de NFkB-p65. Representação imuno-histoquímica de expressão nuclear negativa (A) e positiva (B). Comparação da expressão proteica entre grupos de resposta à platina (C e D) e entre tecido normal e tecidos tumorais (E); Curvas de sobrevida global (F) e livre de doença (G). R = resistente; PS = parcialmente sensível; S12 = sensível após 12 meses; S6 = sensível após 6 meses; N = tecido normal; BG/BL = tumor primário seroso de baixo grau e *borderline*; AG = tumor primário seroso de alto grau; RAG = recidiva do tumor primário de alto grau.

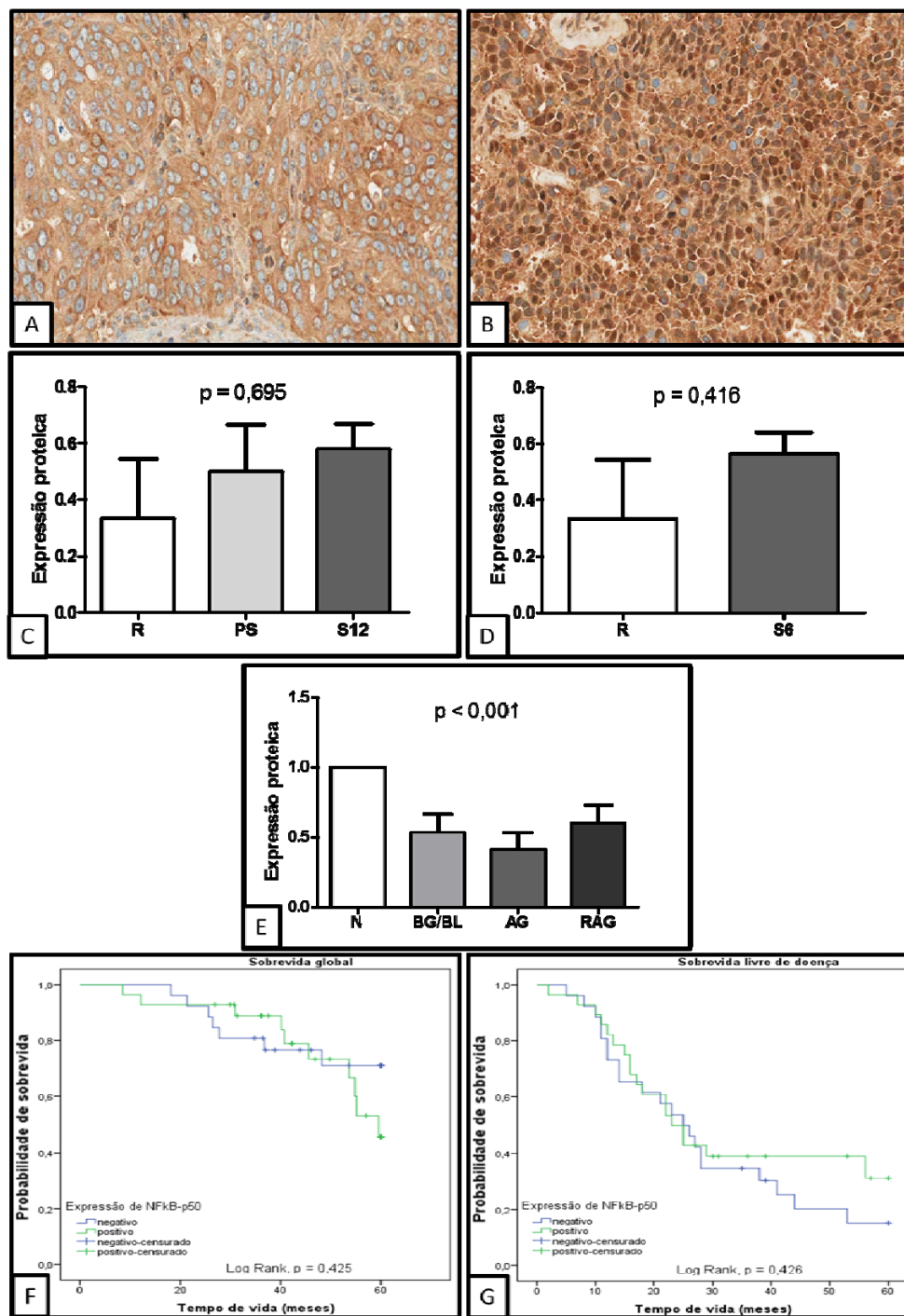


Figura 10 - Expressão de NFkB-p50. Representação imuno-histoquímica de expressão nuclear negativa (A) e positiva (B). Comparação da expressão proteica entre grupos de resposta à platina (C e D) e entre tecido normal e tecidos tumorais (E); Curvas de sobrevida global (F) e livre de doença (G). R = resistente; PS = parcialmente sensível; S12 = sensível após 12 meses; S6 = sensível após 6 meses; N = tecido normal; BG/BL = tumor primário seroso de baixo grau e *borderline*; AG = tumor primário seroso de alto grau; RAG = recidiva do tumor primário de alto grau.

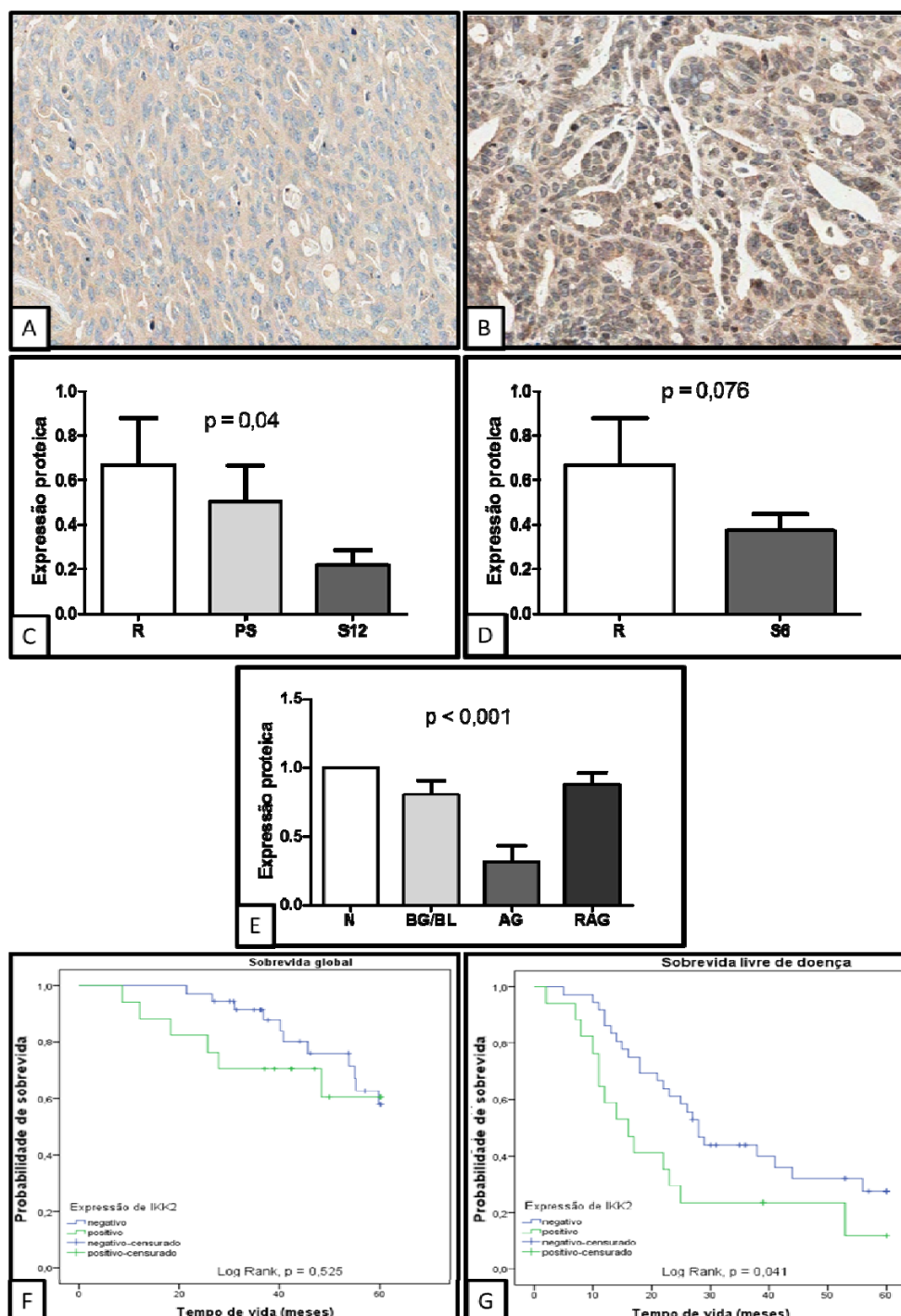


Figura 11 - Expressão de IKK2. Representação imuno-histoquímica de expressão nuclear negativa (A) e positiva (B). Comparação entre os níveis de expressão proteica entre grupos de resposta à platina (C e D) e entre tecido normal e tecidos tumorais (E); Curvas de sobrevida global (F) e livre de doença (G). R = resistente; PS = parcialmente sensível; S12 = sensível após 12 meses; S6 = sensível após 6 meses; N = tecido normal; BG/BL = tumor primário seroso de baixo grau e *borderline*; AG = tumor primário seroso de alto grau; RAG = recidiva do tumor primário de alto grau.

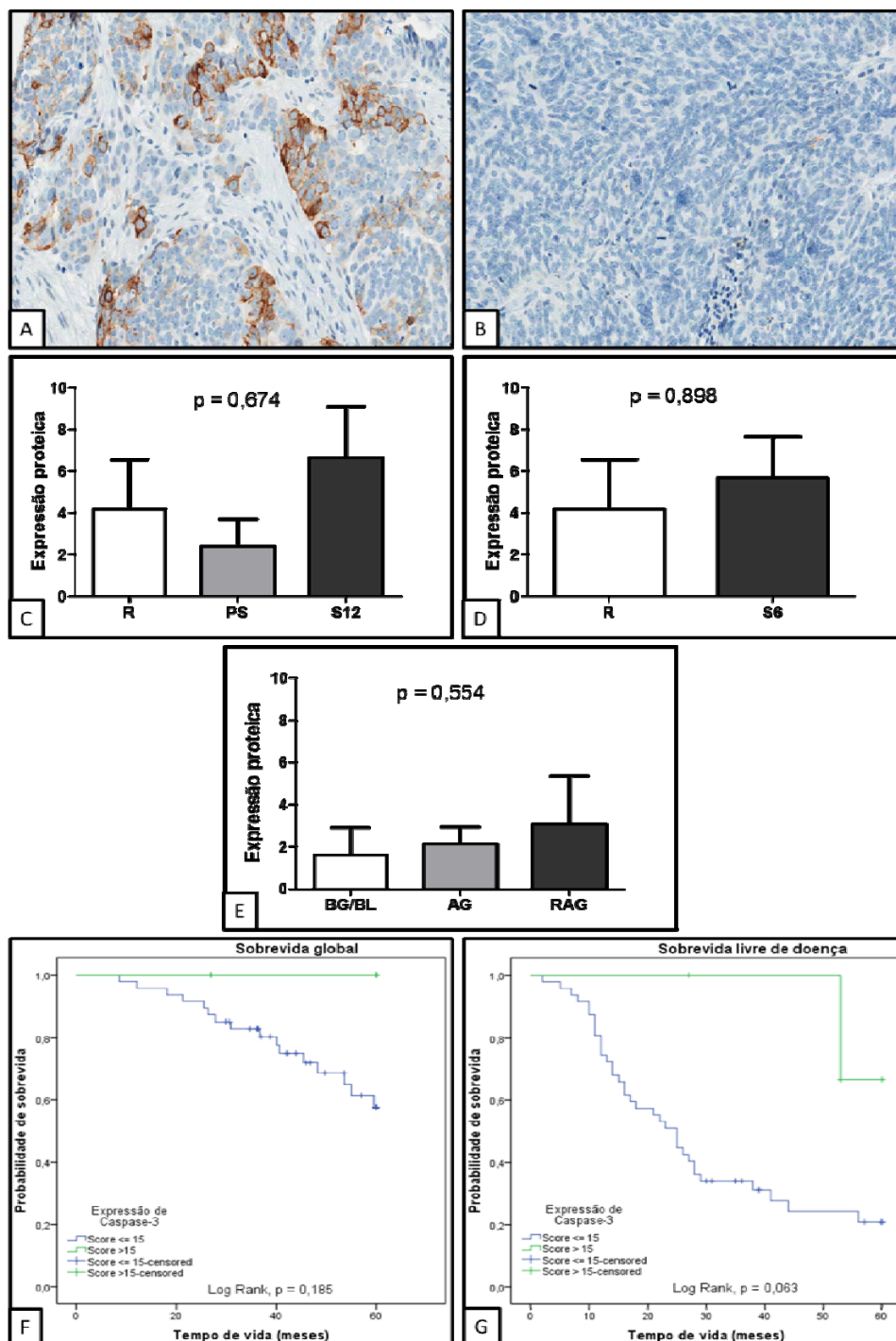


Figura 12 - Expressão de Caspase-3. Representação imuno-histoquímica de expressão positiva (A) e negativa (B); Comparação dos níveis expressão proteica entre grupos de resposta à platina (C e D) e entre tecidos tumorais (E); Curvas de sobrevida global (F) e livre de doença (G). R = resistente; PS = parcialmente sensível; S12 = sensível após 12 meses; S6 = sensível após 6 meses; BG/BL = tumor primário seroso de baixo grau e *borderline*; AG = tumor primário seroso de alto grau; RAG = recidiva do tumor primário de alto grau.

5.2.7 Correlação e comparação entre expressões de OLFM4, GRIM-19, NFkB-p65, NFkB-p50/105, IKK2 e Caspase-3

Quando se comparou a relação entre as expressões das proteínas, não foi observada correlação entre as expressões de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3 (Tabela 9) e não houve diferença de expressão de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3 entre as expressões positivas e negativas de NFkB-p65, NFkB-p50 e IKK2 (Tabela 10).

Tabela 9 - Correlação entre as expressões de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3.

Expressão proteica	Média	Desvio padrão	Coefficiente de correlação	Valor de p
OLFM4	194,81	19,452	0,11	0,348
GRIM-19	184,26	32,072		
OLFM4	194,81	19,452	-0,114	0,437
Caspase-3	5,51	12,486		
GRIM-19	184,26	32,072	0,037	0,796
Caspase-3	5,51	12,486		

*Teste de correlação de Spearman. Nível de significância $p \leq 0,05$.

Tabela 10 - Comparação da expressão de OLFM4, GRIM-19 e Caspase-3 entre as expressões positivas e negativas de NFkB-p65, NFkB-p50 e IKK2.

Variável	Categoria	OLFM4	Valor de p	GRIM-19	Valor de p	Caspase-3	Valor de p
NFkB-p65	Positivo	198,64	0,126	179,55	0,166	3,9	0,138
	Negativo	192		187,5		6,63	
NFkB-p50	Positivo	196,3	0,317	187,5	0,715	3,6	0,068
	Negativo	193,2		180,77		7,35	
IKK2	Positivo	199,37	0,470	192,35	0,057	7,18	0,826
	Negativo	192,78		180		3,6	

*Teste Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

5.2.8 Positividade de IKK2 em conjunto com positividade de NFkB-p65

Casos IKK2^{positivo}/NFkB-p65^{positivo} foram predominantemente encontrados nas pacientes resistentes após seis meses do término da quimioterapia ($p = 0,036$; Figura 16A). Além disso, pacientes que apresentaram este padrão de positividade (IKK2^{positivo}/NFkB-p65^{positivo}) exibiram menor probabilidade de sobrevida global ($p = 0,026$; Figura 16B).

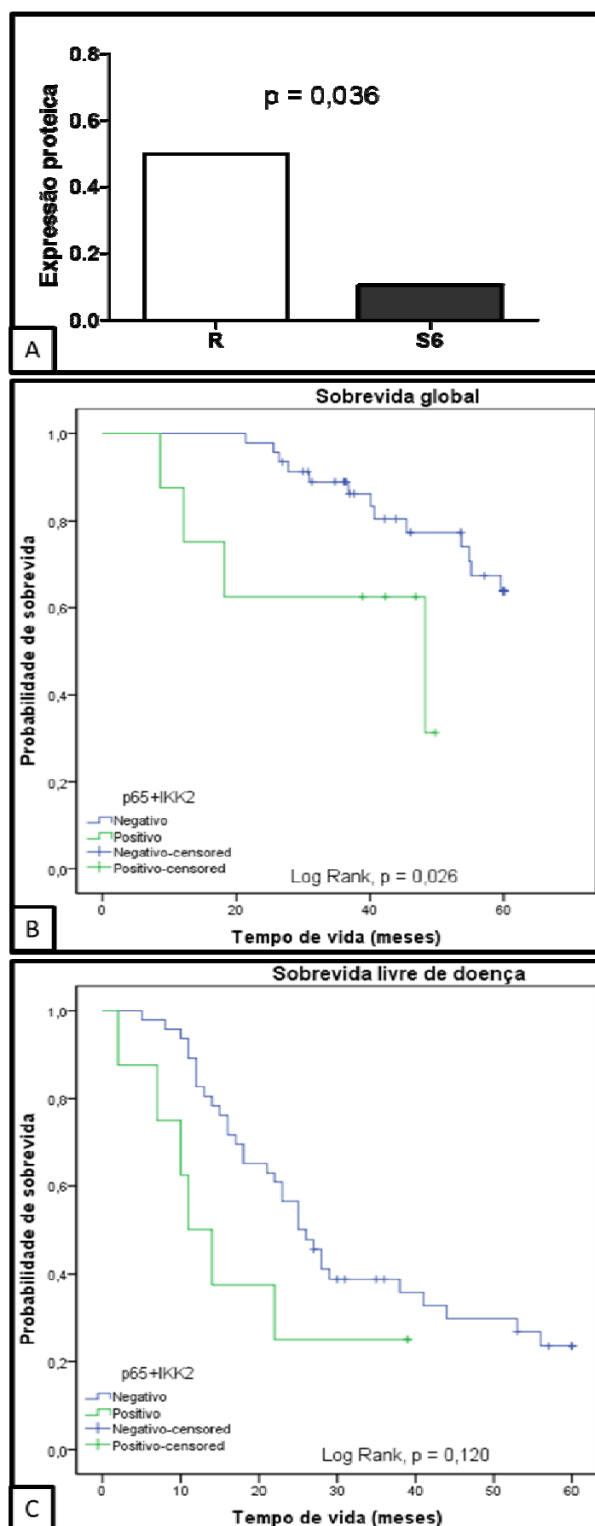


Figura 13 - Expressão de IKK2^{positivo}/NFkB-p65^{positivo}. Comparação dos níveis de expressão proteica entre os grupos de resposta à platina (A); Curvas de sobrevivência global (B) e livre de doença (C). R = resistente; S6 = sensível após 6 meses.

6 DISCUSSÃO

A resposta à quimioterapia baseada em platina é considerada um dos mais importantes fatores prognósticos em pacientes com CSAGO (TRILLSCH et al. 2016). Apesar de exibirem boa resposta à platina, 20-30% das pacientes apresentam resistência a terapia, resultando na recorrência da doença dentro de seis meses após a quimioterapia completa (NAUMANN e COLEMAN 2011). Nestes casos, as opções terapêuticas são limitadas (COLOMBO et al. 2014), e as pacientes apresentam menores chances de sobrevida global (SLAUGHTER et al. 2016).

A resistência à platina pode derivar de mecanismos que aumentam o efluxo da droga ou que afetam a ativação da cascata de apoptose (GALLUZZI et al. 2012). Muitos estudos têm mostrado que o aumento de fatores anti-apoptóticos, como Bcl2, BclX, ou diminuição de expressão de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e caspases, correlacionam com resistência à platina em câncer de ovário (YANG et al. 2004; WILLIAMS et al. 2005; ZIÓŁKOWSKA-SETA et al. 2009). Desta forma, investigamos a expressão proteica de NFkB, IKK2, OLFM4 e GRIM-19 em uma série de 54 casos de CSAGO. Além disso, foi avaliada a imunoexpressão dessas proteínas em diferentes grupos de respostas a quimioterapia e em tumores de grau de diferenciação distintos. O objetivo foi determinar se a expressão destas moléculas estaria relacionada à aquisição de resistência e a progressão dos tumores serosos de ovário. Ainda, foi avaliado se a

expressão de NFkB, IKK2, OLFM4 e GRIM-19 se correlacionavam com a expressão de Caspase-3, e se esta estava envolvida na resposta a quimioterapia e progressão tumoral em CSAGO.

NFkB é uma importante família de fatores de transcrição, com cinco subunidades p65, p52, p50, RelB e c-Rel, envolvidos na regulação do desenvolvimento e da homeostase da célula normal, como nas respostas imune e inflamatória, nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose (OECKINGHAUS e GHOSH 2009). Sabe-se que fatores inflamatórios presentes no microambiente ovariano, devido à ruptura dos folículos para posterior ovulação (BOOTS e JUNGHEIM 2015), ativam a via de NFkB. Neste contexto, observamos no presente estudo uma elevada positividade para NFkB-p65 e NFkB-p50 nos tecidos normais de tuba uterina e ovário (Figuras 12E e 13E, respectivamente), demonstrando que estas proteínas estavam expressas neste tecido.

Diversas vias de sinalizações desencadeadas por uma variedade de fatores de crescimento e citocinas são capazes de ativar a via de NFkB em muitas doenças, como no câncer, levando a uma resposta anti-apoptótica nas células durante a progressão tumoral (GAIKWAD et al. 2015). Tendo em vista que agentes quimioterápicos eliminam as células tumorais através da ativação da via de apoptose, a ativação da via de NFkB pode conferir resistência à quimioterapia.

Ensaio *in vitro* tem associado à ativação de NFkB com resistência a quimioterapia em diversos tumores, tais como mama (WANG W et al. 2015), pâncreas (FUJIOKA et al. 2012) e cólon (KÖRBER et al. 2016). SHUANG et

al. (2016) mostraram em tumores epiteliais de ovário que a positividade nuclear de p50/p105 foi significativamente maior em tecidos resistentes do que em tecidos sensíveis. Similarmente, WANG W et al. (2015) observaram que a positividade de p65 foi maior no grupo resistente em relação ao grupo sensível. Entretanto, nosso trabalho não apresentou relação entre a resposta à quimioterapia e as subunidades p65 (Figuras 12C e D) e p50/p105 (Figuras 13C e D) de NFkB.

NFkB é expresso em diferentes tipos de tumores sólidos, desempenhando vários mecanismos que favorecem a tumorigênese (WU et al. 2015), e apresenta pior prognóstico em muito destes tecidos tumorais, tais como colorretal (YU et al. 2003), colo de útero (LI et al. 2009) e esôfago (HATATA et al. 2012). Vários estudos têm demonstrado que as subunidades p65 e p50 ativam a transcrição de muitos oncogenes, levando a evolução tumoral. MOORCHUNG et al. (2014) observaram que a positividade de p65 foi significativamente maior em adenocarcinoma colorretal pouco diferenciado quando comparado ao adenocarcinoma bem diferenciado. GIOPANOU et al. (2014) observaram maior positividade de p50 em carcinoma de ovário em comparação a tumores *borderline* e cistoadenomas. Corroborando com estes resultados, nosso estudo mostrou que a subunidade p65 apresentou uma positividade aumentada em tumores serosos de alto grau, considerados mais agressivos em comparação aos tumores serosos de baixo grau e *borderline*, considerados tumores de baixo grau de malignidade (Figura 12E). Além disso, o modelo de Cox indicou que NFkB-p65 foi um fator independente associado com menor sobrevida global

em pacientes positivas para a proteína (Tabela 7). Por outro lado, não observamos uma diferença significativa na expressão de p50 entre os tumores serosos baixo grau e *borderline*, alto grau e recidivas dos tumores de alto grau. Estas observações nos levaram a hipótese de que NFkB-p65 pode estar relacionado à tumores mais agressivos, ativando transcrição de genes que levam a progressão do tumor.

IKK2 é uma proteína que apresenta um papel importante para aquisição de resistência à quimioterapia, por participar da ativação da via clássica de NFkB, atuando na fosforilação de moléculas inibitórias (IκBs) e levando-as para degradação proteolítica, permitindo a liberação de NFkB para o núcleo (MIYAMOTO 2011). A atividade de IKK2 ocorre predominantemente no citoplasma. Entretanto, no presente estudo, observamos positividade desta proteína no núcleo. BUSS et al. (2004) demonstraram que IKK2 no núcleo pode fosforilar e regular a atividade nuclear de NFkB-p65. Apesar de IKK2 ser uma molécula ativadora de NFkB, principalmente dos dímeros de p65, ainda não está claro seu papel na aquisição de resistência à terapia em câncer de ovário. Porém, SAKAMOTO et al. (2013) demonstraram que a translocação de IKK2 para o núcleo promove o reparo de DNA por fosforilação da proteína ataxia-telangiectasia mutada (ATM) sob estímulo genotóxico. Na série estudada, identificamos uma significativa positividade de IKK2 em pacientes resistentes à platina (Figura 14C), sugerindo que esta proteína pode participar da aquisição de resistência à quimioterapia em CSAGO.

A atividade de IKK2 pode desempenhar um papel importante no câncer de ovário devido ao seu envolvimento em diferentes eventos biológicos necessários para proliferação e disseminação de células tumorais (HERNANDEZ et al. 2010). Em tumores epiteliais de ovário, SINGHA et al. (2014) demonstraram que a ativação da via de sinalização IKK2 aumentou a expressão de IL-8, citocina que contribui para a sobrevivência, angiogênese e metástase. Além disso, a ativação de IKK2 foi positivamente correlacionada com alta expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KINOSE et al. 2015). HERNANDEZ et al. (2010), ainda, observaram que a expressão de IKK2 foi relacionada à pior sobrevida global. No presente trabalho, a positividade de IKK2 foi significativamente relacionada à localização do tumor, exibindo maior positividade nos implantes em relação aos ovários (Tabela 5). Esta proteína se mostrou um fator independente para aumentar as chances de disseminação peritoneal (Tabela 6). Além disso, esta proteína foi encontrada predominantemente nos casos recidivados e nos tumores primários de alto grau (Figura 14E), e relacionada com pior sobrevida livre de doença (Tabela 8). De acordo com nossos resultados, e em conjunto com a literatura, concluímos que IKK2 pode representar uma importante ferramenta para estabelecer o prognóstico de pacientes com CSAGO e a resposta à quimioterapia.

NFkB e o complexo IKK têm sido descritos como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de câncer de ovário. MABUCHI et al. (2004) demonstraram que a inibição da fosforilação Ikb α s diminui a atividade de NFkB e aumenta a eficácia da cisplatina em modelos *in vitro* e *in vivo*. No

presente estudo, observamos que foi significativo o padrão de expressão NFkB-p65^{positivo}/IKK2^{positivo} em casos resistentes (Figura 16A), os quais apresentaram pior taxa de sobrevida global (Figura 16B). Recentemente, SINGHA et al. (2015) demonstraram que a inibição de IKK em células tumorais de ovário aumentou a eficácia de bortezomibe, um inibidor de proteassomo utilizado como opção para o tratamento de mieloma múltiplo. Estudos clínicos iniciais têm considerado o uso de bortezomibe em combinação com drogas baseadas em platina como uma opção no tratamento de câncer de ovário (AGHAJANIAN et al. 2005, 2009). Portanto, a combinação entre inibidores de IKK e NFkB, bortezomibe e drogas baseadas em platina poderia aumentar a eficácia do tratamento de CSAGO.

OLFM4 é um fator anti-apoptótico que está presente em mecanismos comuns no desenvolvimento do tumor, tais como adesão celular, regulações do processo de apoptose e ciclo celular. O aumento de expressão desta proteína tem sido relatado em diversos cânceres (GRÜTZMANN et al. 2003; LIU et al. 2007, 2008; OUE et al. 2009; VAN DER FLIER et al. 2009; SEKO et al. 2010; YU et al. 2011; LI et al. 2013; DUAN et al. 2014; RAN et al. 2015; SU et al. 2015). CHIN et al. (2008), analisando células da linhagem mielóide, demonstraram que NFkB se liga na região promotora de *OLFM4* e induz a expressão desse gene. Similarmente, KIM et al. (2010) confirmaram que a expressão de OLFM4 é dependente da atividade transcricional de NFkB, e apresenta propriedades anti-apoptóticas em células de cancer gástrico. No presente estudo, não houve associação significativa entre a positividade das subunidades p65/p50 e a expressão de OLFM4 (Tabela 10).

Muitos estudos têm relacionado à expressão de OLFM4 com bom prognóstico. JANG et al. (2015) demonstraram que a expressão de OLFM4 estava aumentada nos adenomas, nos tumores bem diferenciados e em estágios iniciais, em comparação aos tumores pouco diferenciados e em estágios avançados, sugerindo que OLFM4 está envolvido nos estágios iniciais da carcinogênese do câncer gástrico. Em adenocarcinoma seroso de ovário, MA et al. (2016) observaram que a expressão de OLFM4 foi maior em adenocarcinoma bem diferenciado em relação ao tecido normal, e que a expressão diminuiu com o grau de diferenciação. De acordo com esses resultados, a atividade antiapoptótica de OLFM4 parece estar relacionada aos estágios iniciais da tumorigênese em diferentes tecidos tumorais. No entanto, no presente estudo, não foi observada diferença nos níveis de expressão de OLFM4 entre os tecidos normais, tumores serosos de baixo grau e *borderline*, serosos de alto grau e recidivas dos tumores serosos de alto grau, e também não foi encontrada relação de OLFM4 com parâmetros clínico-patológicos e sobrevidas. Estes resultados sugerem que OLFM4 parece não ter relação com CSAGO.

Outra proteína envolvida na regulação do processo de apoptose é GRIM-19, que foi descrita pela primeira vez por ANGELL et al. (2000) como uma proteína indutora de apoptose na presença de IFN- β /ácido retinóico. LI et al. (2014) mostraram que o aumento da expressão de GRIM-19 aumentou as taxas de apoptose em linhagem de carcinoma de células escamosas orais.

GRIM-19 interage com STAT3, inibindo a atividade oncogênica deste fator de transcrição (LUFEL et al. 2003; LI Y-G et al. 2015). Ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a diminuição da expressão de GRIM-19 aumentou a ativação de STAT3 em células tumorais de mama e colo de útero (ZHOU et al. 2009, 2013). Além disso, LI M et al. (2015) demonstraram que o aumento da expressão de GRIM-19 aumentou a sensibilidade à cisplatina em células de carcinoma de células escamosas orais, sugerindo que a combinação de drogas que potencializam a expressão de GRIM-19 com cisplatina pode ser uma potente estratégia para tratamento deste tipo de tumor. No entanto, nossos resultados não encontraram uma diferença significativa na expressão desta proteína entre os pacientes resistentes, os parcialmente sensíveis e os sensíveis (Figuras 11C e D).

A proteína GRIM-19 tem sido descrita como supressor tumoral em diversos tipos de tumores, tais como cabeça e pescoço (LI M et al. 2015, 2014; ZHANG X-Y et al. 2015), mama (ZHANG W et al. 2015), colo de útero (CHENG et al. 2014; ZHOU et al. 2011) e pulmão (FAN et al. 2012). HAO et al. (2015) mostraram em tumores colorretais que a diminuição da expressão de GRIM-19 foi associada com tumores pouco diferenciados, presença de linfonodos, invasão vascular e pior sobrevida. Achados similares foram mostrados por SHAO et al. (2012) em tumores epiteliais de ovário, onde a expressão de GRIM-19 foi significativamente maior em tumores benignos, e estava associada com maior tempo de sobrevida. Nossos resultados mostraram que a expressão de GRIM-19 foi maior nos tumores serosos de baixo grau e *borderline* quando comparados aos tumores serosos de alto

grau e recidivas. HAO et al. (2015), observaram que o aumento de expressão proteica de GRIM-19 foi associado com melhor sobrevida livre de doença, o que corrobora com nossos resultados, onde o modelo de Cox mostrou que GRIM-19 é um fator independente de melhor prognóstico (Tabela 8). Assim, estes resultados sugerem que GRIM-19 pode ser um possível fator prognóstico para prever recorrência da doença.

Modelos experimentais realizados demonstraram que OLFM4 interage com a proteína apoptótica GRIM-19, e essa interação bloqueia a atividade de GRIM-19 como indutor da apoptose (ZHANG et al 2004). Recentemente, CHEN e WU (2015) mostraram uma correlação negativa entre as expressões de OLFM4 e GRIM-19 em tumores colorretais, que apresentaram forte expressão de OLFM4 e diminuição da expressão de GRIM-19, sugerindo que essas duas moléculas podem estar envolvidas na proliferação celular e desenvolvimento desses tumores. No presente estudo, não encontramos correlação significativa entre os níveis de expressão proteica de OLFM4 e GRIM-19 (Tabela 9).

Apesar de OLFM4, GRIM-19 e NFkB serem descritas como reguladores da via de apoptose, não está claro o mecanismo pelo qual essa regulação ocorre em CSAGO. ZHANG et al. (2004) demonstraram que a expressão de OLFM4 inibiu a liberação de citocromo c da mitocôndria e a ativação de caspase-3 e -9, atenuando, assim, a apoptose de células induzidas por estresse oxidativo em células de câncer gástrico. Similarmente, LIU et al. (2012) demonstraram que a inibição de OLFM4 aumentou a atividade da caspase-3 em tumores gástricos. Alguns trabalhos

têm mostrado que o aumento da expressão de GRIM-19 aumenta a expressão de caspases-3, -8 e -9 em câncer gástrico e carcinoma hepatocelular (BU et al. 2013; KONG et al. 2014). Além disso, a expressão das caspases tem se correlacionado negativamente com a expressão de NFkB e Bcl-2 em células de câncer de ovário (GAIKWAD et al. 2015). De acordo com nossos resultados, a expressão de OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 não apresentaram correlação com a expressão de caspase-3 (Tabelas 9 e 10). Entretanto, dada a complexidade da via de apoptose e sua regulação, mais estudos envolvendo outras moléculas relacionadas à esta via são necessários a fim de elucidar o papel desses marcadores na regulação da apoptose em CSAGO.

A família das caspases estão compreendidas em uma ampla variedade de subunidades, que exercem um importante papel na ativação da cascata de apoptose. As caspases-8 e -9 são moléculas iniciadoras da via de apoptose através da via extrínseca e intrínseca, respectivamente, e culminam na ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7 (KIRAZ et al. 2016). A caspase-3 ativa a morte celular através da fragmentação do DNA (LAKHANI et al. 2006), e sua diminuição tem sido associada à resistência a drogas que induzem apoptose (FRIEDRICH et al. 2001; DEVARAJAN et al. 2002). KATO et al. (2015) observaram que a expressão positiva de caspase-3 foi significativamente correlacionada com alta sensibilidade à platina em câncer de colo do útero. YANG et al. (2004) demonstraram que a expressão de caspase-3 foi significativamente menor em linhagens de câncer de ovário resistentes à platina em comparação às linhagens sensíveis. No presente

estudo, não observamos diferença significativa na expressão de caspase-3 entre os grupos de resposta à platina (Figuras 15C e D), sugerindo que outras subunidades das caspases, além de proteínas anti-apoptóticas, podem estar relacionadas com aquisição de resistência a quimioterapia em CSAGO.

A perda da capacidade de controlar o processo de apoptose permite uma maior sobrevivência da célula tumoral, e, conseqüentemente, a progressão do tumor. GU et al. (2015) observaram que a expressão de caspase-3 foi significativamente menor em câncer de próstata em relação aos tecidos de hiperplasia prostática. Além disso, a expressão de caspase-3 foi associada com melhor sobrevida global e livre de doença em carcinoma seroso de ovário (KLEINBERG et al. 2009). Nossos resultados não mostraram diferença significativa na expressão de caspase-3 entre os tumores serosos de baixo grau e *borderline*, alto grau e recidivas (Figura 15E). Assim, sugerimos que outras moléculas podem estar envolvidas na desregulação deste processo, desencadeando a progressão do tumor.

O processo de apoptose pode ser uma via chave capaz de conferir resistência ou sensibilidade à terapia com platina. Estudos mais profundos acerca de vias regulatórias de apoptose, incluindo os marcadores aqui estudados, podem ser importantes na tentativa de prover valores prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento de pacientes com câncer de ovário a partir de testes imuno-histoquímicos no momento da biópsia. Aqui, GRIM-19 representa um possível marcador de prognóstico e predição de recorrência da doença. A positividade da subunidade p65, em

associação com IKK2, podem representar uma importante ferramenta para estabelecer o prognóstico de pacientes com CSAGO e a resposta à quimioterapia. Além disso, a positividade de IKK2 esteve presente predominantemente nos casos de implantes peritoneais/pélvicos e recidiva, demonstrando estar envolvida com a disseminação de células tumorais e recorrência da doença, e também foi associada com pior sobrevida livre de doença e resistência à quimioterapia. No cenário clínico, a avaliação imuno-histoquímica de IKK2 poderá vir a ser considerado um importante marcador de resposta à quimioterapia e progressão do tumor em pacientes diagnosticadas com CSAGO.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- 1 A positividade para IKK2 foi associada a resistência à quimioterapia.
A expressão conjunta de NFkB-p65 e IKK2 (NFkB-p65^{positivo}/IKK2^{positivo}) também apresentou associação com resistência à quimioterapia e pior sobrevida global;
- 2 As proteínas IKK2 e NFkB-p65 podem ser potenciais preditoras de resposta à quimioterapia em CSAGO;
- 3 A expressão de IKK2 foi relacionada à recorrência e progressão do tumor, e foi associada à pior sobrevida livre de doença, indicando ser um potencial marcador de pior prognóstico em pacientes com CSAGO;
- 4 A proteína IKK2 pode ser um possível alvo terapêutico para o tratamento de pacientes com CSAGO;
- 5 As proteínas NFkB-p50, OLFM4 e GRIM-19 parecem não ter relação com aquisição de resistência à quimioterapia em CSAGO;
- 6 Os maiores níveis de expressão de GRIM-19 foram associados à tumores menos agressivos e melhor sobrevida livre de doença, indicando ser um possível marcador de melhor prognóstico e preditor de recidiva em CSAGO;
- 7 A proteína NFkB-p65 mostrou ser um marcador de pior prognóstico, associada à pior sobrevida global.

- 8 As proteínas OLFM4, NFkB, GRIM-19 e IKK2 podem estar associadas a outros fatores apoptóticos que levam a resistência a quimioterapia, uma vez que não observamos associação entre estas proteínas com caspase-3.

.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aass N, De Mulder PHM, Mickisch GHJ, et al. Randomized phase II/III trial of interferon Alfa-2a with and without 13-cis-retinoic acid in patients with progressive metastatic renal cell Carcinoma: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group (EORTC). **J Clin Oncol** 2005; 23:4172-8.

Aghajanian C, Dizon DS, Sabbatini P, Raizer JJ, Dupont J, Spriggs DR. Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:5943-9.

Aghajanian C, Blessing JA, Darcy KM, et al. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2009; 115:215-20.

Al Bakir M, Gabra H. The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: implications for the future. **Br Med Bull** 2014; 112:57-69.

Alvarenga AW, Coutinho-Camillo CM, Rodrigues BR, et al. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. **J Histochem Cytochem** 2013; 61:272-82.

Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, Hofmann ER, Kalvakolanu D V. Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach. **J Biol Chem** 2000; 275:33416-26.

Bookman MA. Optimal primary therapy of ovarian cancer. **Ann Oncol** 2016; 27 Suppl 1:i58-i62.

Boots CE, Jungheim ES. Inflammation and human ovarian follicular dynamics. **Semin Reprod Med** 2015; 33:270-5.

Booy S, Hofland L, Van Eijck C. Potentials of interferon therapy in the treatment of pancreatic cancer. **J Interferon Cytokine Res** 2015; 35:327-39.

Bu X, Zhao C, Wang W, Zhang N. GRIM-19 inhibits the STAT3 signaling pathway and sensitizes gastric cancer cells to radiation. **Gene** 2013; 512:198-205.

Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK. **J Biol Chem** 2004; 279:55633-43.

Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:5180-6.

Chai EZP, Shanmugam MK, Arfuso F, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy. **Pharmacol Ther** 2016; 162:86-97.

Chen H, Wu Q. Expression of GW112 and GRIM-19 in colorectal cancer tissues. **J BUON** 2015; 20:438-42.

Cheng Y, Zhang H, Zhou Y, Tao F, Yu Y. Decreased expression of GRIM-19 and its association with high-risk HPV infection in cervical squamous intraepithelial neoplasias and cancer. **Clin Investig Med Médecine Clin Exp** 2014; 37:E77-84.

Chidambaram NV, Angell JE, Ling W, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Chromosomal localization of human GRIM-19, a novel IFN-beta and retinoic acid-activated regulator of cell death. **J Interferon Cytokine Res** 2000; 20:661-5.

Chin KL, Aerbajinai W, Zhu J, Drew L, Liu W, Rodgers GP. The regulation of OLFM4 expression in myeloid precursor cells relies on NF- κ B transcription factor. **Br J Haematol** 2008; 143:421-32.

Cho KR, Shih. Ovarian cancer. **Annu Rev Pathol** 2010; 4:287-313.

Colombo P-E, Fabbro M, Theillet C, Bibeau F, Rouanet P, Ray-Coquard I. Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2014; 89:207-16.

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

Davidson B, Tropé CG. Ovarian cancer: diagnostic , biological and prognostic aspects. **Women's Heal** 2015; 10:519-33.

Desai A, Xu J, Aysola K, Gates C, Rice VM. Epithelial ovarian cancer: an overview. **World J Transl Med** 2014; 3:1-8.

Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene** 2002; 21:8843-51.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch** 2005; 446:475-82.

Duan C, Liu X, Liang S, et al. Oestrogen receptor-mediated expression of olfactomedin 4 regulates the progression of endometrial adenocarcinoma. **J Cell Mol Med** 2014; 18:863-74.

Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A systematic review of symptoms for the diagnosis of ovarian cancer. **Am J Prev Med** 2016; 50:384-94.

Fan X-Y, Jiang Z-F, Cai L, Liu R-Y. Expression and clinical significance of GRIM-19 in lung cancer. **Med Oncol** 2012; 29:3183-9.

Faubion SS, MacLaughlin KL, Long ME, Pruthi S, Casey PM. Surveillance and care of the gynecologic cancer survivor. **J Womens Health (Larchmt)** 2015; 24:899-906.

Ferrandina G, Ludovisi M, Lorusso D, et al. Phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in progressive or recurrent ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:890-6.

Friedrich K, Wieder T, Von Haefen C, et al. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. **Oncogene** 2001; 20:2749-60.

Fujioka S, Son K, Onda S, et al. Desensitization of NF κ B for overcoming chemoresistance of pancreatic cancer cells to TNF- α or paclitaxel. **Anticancer Res** 2012; 32:4813-21.

Fung-Kee-Fung M, Kennedy EB, Biagi J, et al. The optimal organization of gynecologic oncology services: a systematic review. **Curr Oncol** 2015; 22:e282-93.

Gaikwad SM, Thakur B, Sakpal A, Singh RK, Ray P. Differential activation of NF- κ B signaling is associated with platinum and taxane resistance in MyD88 deficient epithelial ovarian cancer cells. **Int J Biochem Cell Biol** 2015; 61:90-102.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene** 2012; 31:1869-83.

Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene** 2006; 25:6680-4.

Giopanou I, Bravou V, Papanastasopoulos P, et al. Metadherin, p50, and p65 expression in epithelial ovarian neoplasms: an immunohistochemical study. **Biomed Res Int** 2014; 2014:178410.

Gordon AN, Tonda M, Sun S, Rackoff W, Doxil Study 30-49 Investigators. Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2004; 95:1-8.

Grover PK, Hardingham JE, Cummins AG. Stem cell marker olfactomedin 4: critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis. **Cancer Metastasis Rev** 2010; 29:761-75.

Grützmann R, Pilarsky C, Staub E, et al. Systematic isolation of genes differentially expressed in normal and cancerous tissue of the pancreas. **Pancreatology** 2003; 3:169-78.

Gu J, Ren L, Wang X, Qu C, Zhang Y. Expression of livin, survivin and caspase-3 in prostatic cancer and their clinical significance. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:14034-9.

Guette C, Valo I, Vétillard A, Coqueret O. Olfactomedin-4 is a candidate biomarker of solid gastric, colorectal, pancreatic, head and neck, and prostate cancers. **PROTEOMICS - Clin Appl** 2015; 9:58-63.

Hao M, Shu Z, Sun H, et al. GRIM-19 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. **Hum Pathol** 2015; 46:1815-20.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed Res Int** 2014; 2014:1-23.

Hatata T, Higaki K, Tatebe S, Shomori K, Ikeguchi M. Immunohistochemical study of nuclear factor- κ B expression in esophageal squamous cell carcinoma: prognostic significance and sensitivity to treatment with 5-FU. **Dis Esophagus** 2012; 25:716-22.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. **Cell** 2008; 132:344-62.

Hernandez L, Hsu SC, Davidson B, Birrer MJ, Kohn EC, Annunziata CM. Activation of NF- κ B signaling by inhibitor of NF- κ B kinase increases aggressiveness of ovarian cancer. **Cancer Res** 2010; 70:4005-14.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:714-26.

Huang G, Lu H, Hao A, et al. GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. **Mol Cell Biol** 2004; 24:8447-56.

Huang G, Chen Y, Lu H, Cao X. Coupling mitochondrial respiratory chain to cell death: an essential role of mitochondrial complex I in the interferon-beta and retinoic acid-induced cancer cell death. **Cell Death Differ** 2007; 14:327-37.

Huang J, Hu W, Sood AK. Prognostic biomarkers in ovarian cancer. **Cancer Biomark** 2010; 8:231-51.

Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2573-81.

Imamura H, Ohishi Y, Aman M, et al. Ovarian high-grade serous carcinoma with a noninvasive growth pattern simulating a serous borderline tumor. **Hum Pathol** 2015; 46:1455-63.

Jang BG, Lee BL, Kim WH. Olfactomedin-related proteins 4 (OLFM4) expression is involved in early gastric carcinogenesis and of prognostic significance in advanced gastric cancer. **Virchows Arch** 2015; 467:285-94.

Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:183-203.

Kalvakolanu DV. The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression. **Cytokine Growth Factor Rev** 2004; 15:169-94.

Kalvakolanu DV, Nallar SC, Kalakonda S. Cytokine-induced tumor suppressors: A GRIM story. **Cytokine** 2010; 52:128-42.

Karagiannis GS, Pavlou MP, Saraon P, et al. In-depth proteomic delineation of the colorectal cancer exoproteome: Mechanistic insight and identification of potential biomarkers. **J Proteomics** 2014; 103:121-36.

Kato R, Hasegawa K, Torii Y, Udagawa Y, Fukasawa I. Factors affecting platinum sensitivity in cervical cancer. **Oncol Lett** 2015; 10:3591-98.

Kim KK, Park KS, Song SB, Kim KE. Up regulation of GW112 gene by NFkB promotes an antiapoptotic property in gastric cancer cells. **Mol Carcinog**

2010; 49:259-70.

Kinose Y, Sawada K, Makino H, et al. IKK β regulates VEGF expression and is a potential therapeutic target for ovarian cancer as an antiangiogenic treatment. **Mol Cancer Ther** 2015; 14:909-19.

Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumour Biol** 2016 Apr 9. [Epub ahead of print]

Kleinberg L, Dong HP, Holth A, et al. Cleaved caspase-3 and nuclear factor- κ B p65 are prognostic factors in metastatic serous ovarian carcinoma. **Hum Pathol** 2009; 40:795-806.

Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N. Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells. **Cancer Sci** 2007; 98:334-40.

Kong D, Zhao L, Du Y, et al. Overexpression of GRIM-19, a mitochondrial respiratory chain complex I protein, suppresses hepatocellular carcinoma growth. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:7497-507.

Körber MI, Staribacher A, Ratzenböck I, Steger G, Mader RM. NF κ B-associated pathways in progression of chemoresistance to 5-fluorouracil in an in vitro model of colonic carcinoma. **Anticancer Res** 2016; 36:1631-9.

Koshida S, Kobayashi D, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N. Specific overexpression of OLFM4 GW112/hGC?1 mRNA in colon, breast and lung cancer tissues detected using quantitative analysis. **Cancer Sci** 2007; 98:315-20.

Koti M, Siu A, Clément I, et al. A distinct pre-existing inflammatory tumour microenvironment is associated with chemotherapy resistance in high-grade serous epithelial ovarian cancer. **Br J Cancer** 2015; 112:1215-22.

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science** 2006; 311:847-51.

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

Ledermann JA, Kristeleit RS. Optimal treatment for relapsing ovarian cancer. **Ann Oncol** 2010; 21:i218-22.

Lee CH, Jeon Y-T, Kim S-H, Song Y-S. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. **Biofactors** 2007; 29:19-35.

Li H, Rodriguez-Canales J, Liu W, et al. Deletion of the olfactomedin 4 gene is associated with progression of human prostate cancer. **Am J Pathol** 2013; 183:1329-38.

Li J, Jia H, Xie L, et al. Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2009; 19:1421-6.

Li M, Li Z, Liang C, Han C, Huang W, Sun F. Upregulation of GRIM-19 suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. **Oncol Rep** 2014; 32:2183-90.

Li M, Li Z, Li J, et al. Enhanced antitumor effect of cisplatin in human oral squamous cell carcinoma cells by tumor suppressor GRIM-19. **Mol Med Rep** 2015; 12:8185-92.

Li Y-G, Xia H-J, Tao J-P, et al. GRIM-19-mediated Stat3 activation is a determinant for resveratrol-induced proliferation and cytotoxicity in cervical tumor-derived cell lines. **Mol Med Rep** 2015; 11:1272-7.

Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. **Cell Mol Immunol** 2004; 1:343-50.

Liu R, Yang M, Xiang H, et al. Depletion of OLFM4 gene inhibits cell growth and increases sensitization to hydrogen peroxide and tumor necrosis factor-alpha induced-apoptosis in gastric cancer cells. **J Biomed Sci** 2012; 19:38.

Liu W, Chen L, Zhu J, Rodgers GP. The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. **Exp Cell Res** 2006; 2:1795-7.

Liu W, Zhu J, Cao L, Rodgers GP. Expression of hGC-1 is correlated with differentiation of gastric carcinoma. **Histopathology** 2007; 51:157-65.

Liu W, Liu Y, Zhu J, Wright E, Ding I, Rodgers GP. Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1041-9.

Loar P, Wahl H, Kshirsagar M, Gossner G, Griffith K, Liu JR. Inhibition of glycolysis enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. **Am J Obstet Gynecol** 2010; 202:371.e1-8.

Lu H, Cao X. GRIM-19 is essential for maintenance of mitochondrial membrane potential. **Mol Biol Cell** 2008; 19:1893-902.

Lufei C, Ma J, Huang G, et al. GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. **EMBO J** 2003; 22:1325-35.

Ma H, Tian T, Liang S, et al. Estrogen receptor-mediated miR-486-5p regulation of OLFM4 expression in ovarian cancer. **Oncotarget** 2016; 7:10594-605.

Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, et al. Inhibition of NF B increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. **J Biol Chem** 2004; 279:23477-85.

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

Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, et al. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1645-54.

Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, Dunlop CL, Chao EC, Monk BJ. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. **Gynecol Oncol** 2015; 137:86-92.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Tipos de câncer – ovário**. Disponível em: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>>. [2016 abr. 02]

Miyamoto S. Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage. **Cell Res** 2011; 21:116-30.

Moorchung N, Kunwar S, Ahmed KW. An evaluation of nuclear factor kappa B expression in colorectal carcinoma: an analysis of 50 cases. **J Cancer Res Ther** 2014; 10:631-5.

Moreno TA, Bronner-Fraser M. The secreted glycoprotein noelin-1 promotes neurogenesis in xenopus. **Dev Biol** 2001; 240:340-60.

Moreno TA, Bronner-Fraser M. Noelins modulate the timing of neuronal differentiation during development. **Dev Biol** 2005; 288:434-47.

Naumann RW, Coleman RL. Management strategies for recurrent platinum-resistant ovarian cancer. **Drugs** 2011; 71:1397-412.

Nowak M, Janas Ł, Stachowiak G, Stetkiewicz T, R. Wilczyński J. Current clinical application of serum biomarkers to detect ovarian cancer. **Menopausal Rev** 2015; 4:254-9.

Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2009; 1:a000034-a000034.

Okamoto T, Inozume T, Mitsui H, et al. Overexpression of GRIM-19 in cancer cells suppresses STAT3-mediated signal transduction and cancer growth. **Mol Cancer Ther** 2010; 9:2333-43.

Osman MA, Osman MA, Elkady MS, Nasr KE. Weekly paclitaxel versus three-weekly paclitaxel in recurrent platinum-resistant epithelial ovarian and peritoneal cancers: a phase III study. **Clin Med Insights Oncol** 2016; 10:35-41.

Oue N, Sentani K, Noguchi T, et al. Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients. **Int J cancer** 2009; 125:2383-92.

Pham L V, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. **J Immunol** 2003; 171:88-95.

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

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

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

Prat J. Pathology of cancers of the female genital tract. **Int J Gynaecol Obstet** 2015b; 131 Suppl:S132-45.

Ramalingam P. Morphologic, immunophenotypic, and molecular features of epithelial ovarian cancer. **Oncology (Williston Park)** 2016; 30:166-76.

Ran X, Xu X, Yang Y, et al. A quantitative proteomics study on olfactomedin 4 in the development of gastric cancer. **Int J Oncol** 2015; 47:1932-44.

Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. **J Biol Chem** 2004; 279:38921-35.

Romero I, Bast RC. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. **Endocrinology** 2012; 153:1593-602.

Sakamoto K, Hikiba Y, Nakagawa H, et al. Promotion of DNA repair by nuclear IKK β phosphorylation of ATM in response to genotoxic stimuli. **Oncogene** 2013; 32:1854-62.

Sarojini S, Tamir A, Lim H, et al. Early detection biomarkers for ovarian cancer. **J Oncol** 2012; 2012:709049.

Seko N, Oue N, Noguchi T, et al. Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. **Exp Ther Med** 2010; 1:73-8.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell** 1986; 46:705-16.

Seo S IL, Song SY, Kang MR, et al. Immunohistochemical analysis of NF-kappaB signaling proteins IKKepsilon, p50/p105, p52/p100 and RelA in prostate cancers. **APMIS** 2009; 117:623-8.

Shao Y, Cheng X, Wan X. Expression and clinical significance of GRIM-19 in epithelial ovarian carcinoma [abstract]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi** 2012; 47:751-5.

Shapira I, Oswald M, Lovecchio J, et al. Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes. **Br J Cancer** 2014; 110:976-83.

Shih VF-S, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Res** 2011; 21:86-102.

Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. **J Biochem Mol Biol** 2002; 35:28-40.

Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C. Over-expression of nuclear NF-kB1 and c-Rel correlates with chemoresistance and prognosis of serous epithelial ovarian cancer. **Exp Mol Pathol** 2016; 100:139-44.

Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:5-29.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:7-30.

Singha B, Gatla HR, Manna S, et al. Proteasome inhibition increases recruitment of I κ B kinase β (IKK β), S536P-p65, and transcription factor EGR1 to interleukin-8 (IL-8) promoter, resulting in increased IL-8 production in ovarian cancer cells. **J Biol Chem** 2014; 289:2687-700.

Singha B, Gatla HR, Phyo S, Patel A, Chen Z-S, Vancurova I. IKK inhibition increases bortezomib effectiveness in ovarian cancer. **Oncotarget** 2015; 6:26347-58.

Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The Role of Ubiquitin in NF- κ B Regulatory Pathways. **Annu Rev Biochem** 2009; 78:769-96.

Slaughter K, Holman LL, Thomas EL, et al. Primary and acquired platinum-resistance among women with high grade serous ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2016 May 24; [Epub ahead of print]

Snyder DA, Rivers AM, Yokoe H, Menco BP, Anholt RR. Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein. **Biochemistry** 1991; 30:9143-53.

Song M, DiPaola RS, Cracchiolo BM, et al. Phase 2 trial of paclitaxel, 13-cis retinoic acid, and interferon alfa-2b in the treatment of advanced stage or recurrent cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2014; 24:1636-41.

Su W, Luo L, Wu F, et al. Low expression of olfactomedin 4 correlates with poor prognosis in smoking patients with non-small cell lung cancer. **Hum Pathol** 2015; 46:732-8.

Sun S-C, Ley SC. New insights into NF- κ B regulation and function. **Trends Immunol** 2008; 29:469-78.

Ten Bokkel Huinink W, Gore M, Carmichael J, et al. Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. **J Clin Oncol** 1997; 15:2183-93.

Trillsch F, Mahner S, Hilpert F, et al. Prognostic and predictive effects of primary versus secondary platinum resistance for bevacizumab treatment for platinum-resistant ovarian cancer in the AURELIA trial. **Ann Oncol** 2016 Jun 10. [Epub ahead of print]

Tsuda H, Sasai N, Matsuo-Takasaki M, Sakuragi M, Murakami Y, Sasai Y. Dorsalization of the Neural Tube by Xenopus Tiarin, a Novel Patterning Factor Secreted by the Flanking Nonneural Head Ectoderm. **Neuron** 2002; 33:515-28.

Uray IP, Dmitrovsky E, Brown PH. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic. **Semin Oncol** 2016; 43:49-64.

Van der Flier LG, Haegebarth A, Stange DE, Van de Wetering M, Clevers H. OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. **Gastroenterology** 2009; 137:15-17.

Vargas AN. Natural history of ovarian cancer. **Ecancermedicalscience** 2014; 8:465.

Vaughan S, Coward JI, Bast RC, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:719-25.

Vencken PMLH, Kriege M, Hoogwerf D, et al. Chemosensitivity and outcome of BRCA1- and BRCA2-associated ovarian cancer patients after first-line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients. **Ann Oncol** 2011; 22:1346-52.

Wang L, Wang C, Jin S, Qu D, Ying H. Expression of NF- κ B and PTEN in primary epithelial ovarian carcinoma and the correlation with chemoresistance. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:10953-63.

Wang M, Brown DPG, You J, Bemis KG. Putative surrogate biomarkers to predict patients with acquired platinum resistance in ovarian cancer. **J Mol Biomark Diagn** 2014; 5:

Wang W, Nag SA, Zhang R. Targeting the NF κ B signaling pathways for breast cancer prevention and therapy. **Curr Med Chem** 2015; 22:264-89.

Watson P, Vasen HFA, Mecklin J, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in Lynch Syndrome. **Int J Cancer** 2008; 123:444-9.

Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic testing by cancer site: ovary. **Cancer J** 2012; 18:320-7.

Williams J, Lucas PC, Griffith KA, et al. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. **Gynecol Oncol** 2005; 96:287-95.

Wu D, Wu P, Zhao L, et al. NF- κ B expression and outcomes in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)** 2015; 94:e1687.

Yaacoub K, Pedeux R, Tarte K, Guillaudeux T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. **Cancer Lett** 2016; 378:150-9.

Yang X, Zheng F, Xing H, et al. Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2004; 130:423-8.

Yu H-G, Yu L-L, Yang Y, et al. Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis. **Oncology** 2003; 65:37-45.

Yu L, He M, Yang Z, et al. Olfactomedin 4 is a marker for progression of cervical neoplasia. **Int J Gynecol Cancer** 2011; 21:367-72.

Zhang J, Liu W, Tang DC, et al. Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development. **Gene** 2002; 283:83-93.

Zhang J, Yang J, Roy SK, et al. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:9342-7.

Zhang L, Gao L, Li Y, et al. Effects of plasmid-based Stat3-specific short hairpin RNA and GRIM-19 on PC-3M tumor cell growth. **Clin Cancer Res** 2008; 14:559-68.

Zhang X, Huang Q, Yang Z, Li Y, Li C-Y. GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth. **Cancer Res** 2004; 64:2474-81.

Zhang X-Y, Li M, Sun K, et al. Decreased expression of GRIM-19 by DNA hypermethylation promotes aerobic glycolysis and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 2015; 6:101-15.

Zhang W, Du Y, Jiang T, Geng W, Yuan J, Zhang D. Upregulation of GRIM-19 inhibits the growth and invasion of human breast cancer cells. **Mol Med Rep** 2015; 12:2919-25.

Zhou T, Chao L, Rong G, Wang C, Ma R, Wang X. Down-regulation of GRIM-19 is associated with STAT3 overexpression in breast carcinomas. **Hum Pathol** 2013; 44:1773-9.

Zhou Y, Li M, Wei Y, et al. Down-regulation of grim-19 expression is associated with hyperactivation of STAT3-induced gene expression and tumor growth in human cervical cancers. **J Interf Cytokine Res** 2009; 29:695-704.

Zhou Y, Wei Y, Zhu J, et al. GRIM-19 disrupts E6/E6AP complex to rescue p53 and induce apoptosis in cervical cancers. **PLoS One** 2011; 6:e22065.

Ziółkowska-Seta I, Madry R, Kraszewska E, et al. TP53, BCL-2 and BAX analysis in 199 ovarian cancer patients treated with taxane-platinum regimens. **Gynecol Oncol** 2009; 112:179-84.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 15 de Abril de 2015.

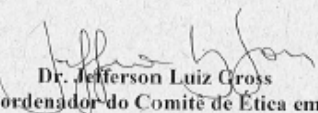
Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha
Aluno: Felipe Ilelis de Barros Silva (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1863/14B
“Validação e análise da expressão gênica de OLFM4 em carcinoma seroso de ovário de alto grau.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 14/04/2015, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Estudo de genes diferencialmente expressos em carcinomas serosos de ovário de pacientes responsivas ou não à quimioterapia”, registrado neste CEP sob nº 1863/14. O projeto afiliado em referência será o projeto de Mestrado do aluno *Felipe Ilelis de Barros Silva*.
- Projeto de Mestrado, datado de 17 de março de 2015.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



São Paulo, 25 de maio de 2016.

Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha
Aluno: Felipe Iléis de Barros Silva (Mestrado)

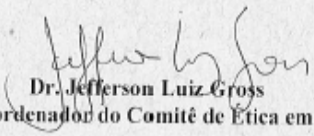
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1863/14B

“Avaliação do perfil de expressão proteica de OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 e sua relação com resposta a quimioterapia em pacientes com carcinoma seroso de ovário de alto grau”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **24/05/2016**, **tomaram conhecimento** do seguinte documento:

- Comunicação e justificativa de alteração de título do estudo acima mencionado, de *“Validação e análise da expressão gênica de OLFM4 em carcinoma seroso de ovário de alto grau”* para *“Avaliação do perfil de expressão proteica de OLFM4, GRIM-19, NFkB e IKK2 e sua relação com resposta a quimioterapia em pacientes com carcinoma seroso de ovário de alto grau”*, em carta datada de 09 de maio de 2016;
- Alteração na metodologia, em documento datado de 09 de maio de 2016.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa