



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EXPRESSÃO DE PARKINA E DE SEUS ALVOS DE UBIQUITINAÇÃO
APEX1, BCL2L1 E CD36 EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE OVÁRIO
SEROSO**

MESTRANDA: BIANCA BORGES CABRAL
ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a VANESSA SANTOS SOTOMAIOR
COORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a LUCIA DE NORONHA

CURITIBA
2020

BIANCA BORGES CABRAL

**EXPRESSÃO DE PARKINA E DE SEUS ALVOS DE UBIQUITINAÇÃO
APEX1, BCL2L1 E CD36 EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE OVÁRIO
SEROSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Santos Sotomaior

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia de Noronha

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

C117e
2020 Cabral, Bianca Borges
Expressão de parkina e de seus alvos de ubiquitinação APEX1, BCL2L1 e CD36 em amostras de câncer de ovário seroso / Bianca Borges Cabral; orientadora: Vanessa Santos Sotomaior ; coorientadora: Lucia de Noronha. – 2020
52, [16] f. : il. ; 30 cm
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020
Bibliografias: 44-51
1. Câncer. 2. Câncer - Aspectos genéticos. 3. Neoplasias ovarianas. 4. Ovários – Tumores. I. Sotomaior, Vanessa Santos. II. Noronha, Lúcia de. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 616.994



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 15 dias do mês de abril de 2020 às 14:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação “EXPRESSÃO DE PARKINA, APEX1, BCL2L1 E CD36 EM TUMORES EPITELIAIS SEROSOS DE OVÁRIO” apresentado por Bianca Borges Cabral para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior – Presidente (PUCPR)	
Prof. Dr. Paulo Gustavo Kotze (PUCPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Sebastião (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

Conceito: APROVADA

Prof. Dr. Paulo Gustavo Kotze

Conceito: APROVADA

Profa. Dra. Ana Paula Sebastião

Conceito: APROVADA

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida e por me permitir viver esta intensa jornada.

Sou grata pela família que me foi concedida e pelo amor incondicional que recebo todos os dias. Aos meus pais **Adriana Araújo Borges Cabral** e **Ezequias Falcão Cabral** por todo apoio, educação e valores que me foram passados. São os maiores exemplos que eu poderia ter. Me inspiram e me motivam a não desistir dos meus sonhos. Sou eternamente grata por me fazerem ser quem sou. Vocês são a razão de tudo isso.

Ao meu namorado **Eduardo Ferreira Medici**, que muito além disso, se tornou parte de mim e da minha família. Quem sempre me apoiou e me fez seguir em frente, independentemente de qualquer dificuldade. Você é meu porto seguro.

A todos os meus amigos e familiares que de alguma forma estiveram comigo e contribuíram para que eu pudesse estar aqui hoje.

Gostaria de agradecer à **PUCPR** por me proporcionar todos esses anos de imprescindíveis ensinamentos. Igualmente, pela concessão de isenção/bolsa CIP.

À minha orientadora, Doutora **Vanessa Santos Sotomaior**, por me inspirar desde o momento em que a conheci. Agradeço profundamente por todos os ensinamentos passados, por todo carinho, acolhimento e por sua orientação na realização deste sonho.

À Professora **Lucia de Noronha**, coorientadora deste projeto e profissional que tenho grande admiração. Gostaria de agradecer por todo aprendizado que me proporcionou desde o início desta pesquisa, ainda mesmo durante a graduação.

Agradeço a todos os meus colegas de grupo de pesquisa. À **Phamela Ferreira Klimczak** por me ajudar nos primeiros passos na pesquisa, me transmitindo valores pessoais e profissionais que nunca esquecerei. À **Claudia Caroline Veloso da Silva** que me inspira todos os dias com sua dedicação e com a maneira como sempre ampara a todos. À **Amanda Pereira Agostinho**, por sua amizade e companheirismo nos melhores momentos e nas mais intensas dificuldades do mestrado. À **Rita Maria Venancio M. Rocha** por toda sua experiência e conhecimentos compartilhados. À **Ana Paula Derghan** por todas as suas contribuições no desenvolvimento deste projeto. À **Eduardo H. Nunes, Steffanie Skau Amadei e Julianna Alves Rabêlo**, meu agradecimento a todos vocês.

À Professora **Márcia Olandoski** por seu inestimável auxílio no desenvolvimento das análises estatísticas deste trabalho.

À toda equipe da Patologia da PUCPR, que foi parte essencial na execução deste projeto. À **Ana Paula Camargo Martins, Caroline Busatta Vaz de Paula e Seigo Nagashima**. Sou grata por toda ajuda e paciência que sempre tiveram comigo.

RESUMO

O câncer de ovário é o sétimo câncer mais incidentes na população feminina brasileira e a neoplasia ginecológica de maior letalidade. Os tumores epiteliais serosos de ovário são os mais frequentes (~80%) e os seus subtipos mais comuns são cistoadenomas, tumores *borderline* e adenocarcinomas. A origem dos adenocarcinomas de modo geral ocorre a partir de lesões que seguem a sequência cistoadenoma-*borderline*-adenocarcinoma (baixo grau) ou de células das tubas uterinas (alto grau). Parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 são proteínas envolvidas na supressão, desenvolvimento, sobrevivência e progressão tumoral e, desta forma, o estudo da sua expressão tem como objetivo prospectar novos marcadores tumorais que possam ser empregados na estratificação de riscos, na indicação de prognóstico e de manejo das pacientes, além de auxiliar na caracterização dos subtipos de tumores de ovário. Neste contexto, os perfis de expressão imunoistoquímica destas quatro proteínas foram avaliados em 58 amostras de tumores serosos: cistoadenomas (n=20), *borderlines* (n=15) e adenocarcinomas (n=23). Parkina ($p=0,001$), APEX1 ($p=0,000$) e BCL2L1 ($p=0,001$) foram diferentemente expressas entre os três subtipos serosos estudados. Quando a expressão das proteínas foi comparada considerando apenas dois subtipos tumorais, foi possível observar que: todas as proteínas tiveram diferença de expressão entre cistoadenomas e adenocarcinomas; entre cistoadenomas e tumores *borderline*, apenas BCL2L1 não apresentou diferença; e entre os tumores *borderline* e adenocarcinomas apenas APEX1 foi diferentemente expressa ($p=0,005$). APEX1 também demonstrou diferença significativa de expressão de acordo com a classificação dos adenocarcinomas em seroso em alto e baixo graus. Uma curva ROC foi ajustada para a expressão de APEX1 nos subtipos adenocarcinoma e *borderline*, sendo possível encontrar uma correlação entre as duas variáveis ($p=0,010$), com ponto de corte equivalente ao Escore de Allred 7, sensibilidade de 77,3% e especificidade de 73,3%. Estes resultados indicam que APEX1 é capaz de discriminar bem entre os tumores *borderline* e adenocarcinoma e poderá auxiliar em uma melhor diferenciação entre estes subtipos.

Palavras-chave: câncer de ovário epitelial; tumor seroso *borderline*; adenocarcinoma seroso; parkina; APEX1.

LISTA DE ABREVIATURAS

APEX1 – do inglês, apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1;
BAK – do inglês, *BCL2 antagonist/killer 1*;
BAX – do inglês, *BCL2 associated X, apoptosis regulator*;
BCL-2 – do inglês, *BCL2 apoptosis regulator*;
BCL2L1 – do inglês, *BCL2 like 1*;
BRCA1 – do inglês, *BRCA1 DNA repair associated*;
BRCA2 – do inglês, *BRCA2 DNA repair associated*;
BRIP1 – do inglês, *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*;
CA 125 – antígeno do câncer 125;
CA 15.3 – antígeno do câncer 15.3;
CA 72.4 – antígeno do câncer 72.4;
CD36 – do inglês, *CD36 molecule*;
CO – câncer de ovário;
COE – câncer de ovário epitelial;
CTLA-4 – do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*;
FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia;
HE - hematoxilina-eosina;
HEG – Hospital Erasto Gaertner;
HIF-1 α – *hypoxia inducible factor 1*;
HNSG – Hospital Nossa Senhora das Graças;
HSC – Hospital Santa Cruz;
HTRA1 – do inglês, *HtrA serine peptidase 1*;
INCA – Instituto Nacional do Câncer;
KRAS – do inglês, *kristen ras*;
LSD – do inglês, *least significant difference*;
MCA – antígeno mucinóide associado ao carcinoma;
MLH1 – do inglês, *mutL homolog 1*;
NF-K β – do inglês, *nuclear factor kappa B subunit 1*;
OMS – Organização Mundial da Saúde;
PD1 – do inglês, *programmed cell death-1*;
PINK1 – do inglês, *PTEN induced kinase 1*;

PLAP – fosfatase alcalina placentária;
PRKN – do inglês, *parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*;
PTEN – do inglês, *phosphatase and tensin homolog*;
PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná;
RAD51D – do inglês, *RAD51 paralog D*;
ROS – do inglês, *reactive oxygen species*;
ROC – do inglês, *receiver operating characteristic*;
STIC – do inglês *Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma*;
TMA – do inglês, *Tissue Micro-Array*;
TP53 – do inglês, *tumor protein p53*;
µm – micrômetro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Os tumores de ovário.....	1
1.2 Os tumores de ovário epitelial.....	6
1.3 As proteínas parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 em tumores de ovário	9
1.3.1 Parkina.....	9
1.3.2 APEX1	13
1.3.3 BL2L1	14
1.3.4 CD36.....	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Amostras estudadas	19
4.2 Preparo das lâminas	20
4.3 Imunoistoquímica.....	21
4.4 Análise morfométrica	22
4.5 Escore de Allred.....	24
4.6 Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Estatística descritiva das amostras	26
5.2 Expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas	27
5.3 Análises comparativas, de correlação e de associação	30
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	52
ANEXO A	53
ANEXO B	57
ANEXO C	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os tumores de ovário

Os tumores de ovário são heterogêneos, apresentam comportamentos clínicos distintos e sua caracterização histopatológica é complexa (Cannistra, 2004). A etiologia, patogênese e progressão de alguns destes tumores ainda constituem temas de intensa discussão (La Vecchia, 2017; Meinhold-Heerlein e Hauptmann, 2014).

Os tumores de ovário podem ser classificados em tumores de células germinativas, que se originam a partir das células produtoras de óvulos e tendem a acometer mulheres mais jovens; tumores estromais, desenvolvidos a partir de células produtoras de hormônios e geralmente diagnosticados em estádios iniciais; e os tumores epiteliais, que se desenvolvem no epitélio dos ovários e tubas uterinas, correspondendo a ~80% dos casos e sendo os mais incidentes em mulheres acima dos 50 anos (Capriglione *et al.*, 2017; INCA, 2019). Os tumores germinativos, estromais e epiteliais podem ainda ser sub-classificados (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos tumores de ovário.

GERMINATIVOS	ESTROMAIS	EPITELIAIS
Disgerminoma	Células granulosas	Serosos
Seio endodérmico	Granulosa-teca	Mucinosos
Carcinoma embrionário	<i>Sertoli-Leydig</i>	Endometrióides
Polioembrioma	Tecomas	Células claras
Coriocarcinoma	Fibroma	Brenner
Teratoma		Indiferenciados
Formas mistas		

Adaptado de: American Cancer Society, 2018; World Health Organization, 2014.

O estadiamento é fator prognóstico essencial para os tumores de ovário, descreve importantes aspectos destas neoplasias, tais como sua localização e disseminação, e auxilia na definição do tratamento. O estadiamento dos tumores de ovário e de trompas de Falópio geralmente é realizado pelo sistema da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Tabela 2), que é fundamentado nos resultados de cirurgia para determinação do tamanho do tumor e de ausência ou presença de

metástase nos linfonodos e à distância. O estadiamento dos casos de tumores de ovário é especialmente útil para estimativa das taxas de sobrevivência, visto que a sobrevivência global em cinco anos pode chegar em até ~95% para os casos de tumores localizados, enquanto para aqueles com implantação regional e disseminação tumoral, as taxas caem para ~70% e ~30%, respectivamente (Capriglione *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018).

Tabela 2. Estadiamento para tumores de ovário estabelecido pela FIGO.

Estádios	Características
I	Tumor limitado aos ovários.
IA	Tumor limitado a um ovário.
IB	Tumor envolvendo os dois ovários.
IC	Tumor no estágio IA ou IB, mas com tumor na superfície ou com ascite ou lavado peritoneal com células neoplásicas presentes.
II	Tumor com extensão à pélvis ou primário do peritônio.
IIA	Tumor com extensão e/ou metástases para útero e/ou tuba uterina.
IIB	Tumor com extensão para outros tecidos pélvicos.
III	Tumor com implantes além da pélvis e/ou linfonodos intra-abdominais comprometidos.
IIIA	Linfonodos comprometidos e/ou disseminação peritoneal microscópica além da pélvis.
IIIB	Tumor em um ou ambos ovários com implante peritoneal extra-pélvico ≥ 2 cm.
IIIC	Tumores com implantes peritoneais > 2 cm e/ou linfonodos inguinais ou pélvicos/retroperitoneais positivos.
IV	Tumor com metástases à distância.
IVA	Derrame pleural com citologia positiva.
IVB	Metástases para parênquima hepático ou esplênico. Metástases para órgãos extra-abdominais, incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal.

Fonte: Adaptado de Mutch e Prat, 2014.

No triênio de 2020-2022, são esperados ~6.650 novos casos por ano de câncer de ovário (CO) na população brasileira. Esta neoplasia passa a ser a sétima mais incidente no Brasil (Figura 1), com um risco estimado de 6,18 casos a cada 100 mil mulheres. O CO ocupa a sétima posição nas Regiões Nordeste (5,67 /100 mil) e Norte

(3,28/100 mil). Nas Regiões Sudeste (7,01/100 mil) e Centro-Oeste (5,09/100 mil) ocupa a oitava posição e, na região Sul (7,06/100 mil), a nona (INCA, 2020). Todas as estimativas citadas desconsideram o câncer de pele não melanoma.

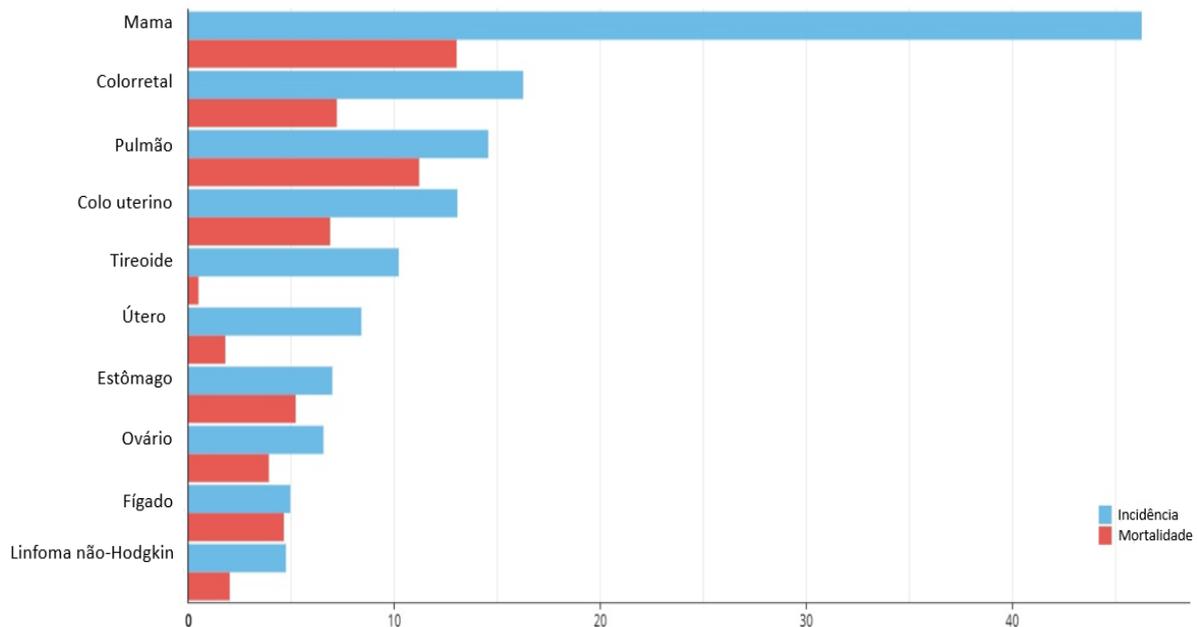
Figura 1. Distribuição estimada para 2020-2022 dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres no Brasil, exceto câncer de pele não melanoma.

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Fonte: INCA, 2020.

No ano de 2018, estima-se que ~20 mil mulheres foram diagnosticadas com CO nos Estados Unidos e ~75% destas pacientes possam ter ido a óbito pela doença (Corzo *et al.*, 2017). No Brasil, em 2017, foram registrados ~3.879 óbitos por CO (INCA, 2019). Esta alta mortalidade (Figura 2) se deve, em parte, à escassez de métodos específicos para sua detecção precoce, mas também pelas dificuldades de acesso aos serviços de saúde especializados, o que leva muitas vezes ao diagnóstico do CO em estádios avançados, contribuindo para a observação de uma sobrevida global inferior a 45% em cinco anos (Reis, 2005; Bast *et al.*, 2009; Panuccio *et al.*, 2016). O CO é o câncer ginecológico de maior letalidade (Chyke *et al.*, 2016).

Figura 2: Estimativa mundial das taxas de incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncer para mulheres em 2018.



Fonte: Adaptado de *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2019*.

Entre os métodos disponíveis para diagnóstico dos tumores de ovário, estão a ultrassonografia pélvica, a ressonância magnética, a tomografia computadorizada e os marcadores biológicos.

Na oncologia, a maioria dos marcadores empregados no diagnóstico, acompanhamento e prognóstico são proteínas produzidas pelas células transformadas em concentrações diferentes das esperadas para as equivalentes não-transformadas (Pacheco *et al.*, 2002). Estas proteínas podem estar presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, nos quais o seu aparecimento ou alterações em suas concentrações e estruturas estão relacionados com a proliferação celular alterada ou com a resposta do organismo a esta proliferação (Valente e Massabki, 2011). As técnicas de detecção destes marcadores devem ser sensíveis o suficiente para permitir sua identificação em baixas concentrações, condição comum observada nos casos de diagnóstico precoce. O uso de marcadores tumorais contribui para o manejo clínico dos pacientes, sendo ferramenta complementar no diagnóstico, na definição do tratamento, na detecção de recidiva, no prognóstico e no monitoramento da resposta terapêutica (Almeida *et al.*, 2007).

Os marcadores do CO são CA 125 (antígeno do câncer 125), CA 72.4 (antígeno carboidrato 72.4), CA 15.3 (antígeno carboidrato 15.3), proteína do gene *KRAS* (do

inglês, *kristen ras*), PLAP (fosfatase alcalina placentária), MCA (antígeno mucinóide associado ao carcinoma), entre outros. Atualmente, apenas o CA 125 é validado para uso clínico (Appel *et al.*, 2009), devido à especificidade e à sensibilidade limitadas dos outros marcadores disponíveis (Colombo *et al.*, 2019).

A resistência à quimioterapia e as altas taxas de recorrência, à semelhança do diagnóstico tardio, impactam as taxas de sobrevivência de pacientes com CO (Londero *et al.*, 2014). A primeira linha de tratamento consiste na cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia à base de platina, como cisplatina ou carboplatina em combinação com quimioterápicos taxanos. Os tratamentos hormonais também são utilizados, como o tamoxifeno, que bloqueiam os receptores de estrogênio em células cancerígenas, impedindo seu crescimento e divisão (Zhou *et al.*, 2019).

As terapias imunológicas começam a ganhar destaque na oncologia e incluem: vacinas, terapias baseadas na utilização de células T, vírus oncolíticos e bloqueios imunológicos, como os anticorpos direcionados para PD1 (do inglês, *programmed cell death-1*) e CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*). Atualmente, ainda não foram aprovadas terapias imunológicas para o CO, provavelmente por sua ineficiência atribuída à baixa imunogenicidade tumoral intrínseca, expressão de múltiplos receptores inibitórios de células T e sua capacidade de regulação de pontos imunológicos quando estes são bloqueados (Odunsi *et al.*, 2017).

O CO acomete preferencialmente mulheres de origem caucasiana nos períodos de pré- e pós-menopausa, e minoritariamente mulheres negras, hispânicas e de origem indígena, sendo a idade média ao diagnóstico superior a 50 anos (Zheng *et al.*, 2018). A incidência desta patologia é maior em países mais industrializados e de níveis socioeconômicos elevados, como Estados Unidos, países da Europa e Nova Zelândia, com exceção apenas do Japão (Ristow *et al.*, 2006).

A incidência do CO está relacionada a fatores genéticos, hormonais, de estilo de vida e ambientais. A multiparidade, a amamentação, a menarca tardia, o uso de anticoncepcionais orais, uma dieta equilibrada e a prática regular de exercícios físicos são considerados fatores protetores contra o desenvolvimento de alguns tipos de CO (Webb & Jordan, 2017). Por outro lado, entre os principais fatores de risco, encontram-se a nuliparidade, a obesidade (Bae *et al.*, 2014), a origem europeia, o uso de drogas indutoras de ovulação, os altos níveis de estrógenos e androgênios e a ocorrência de câncer de mama, de útero e colorretal (Cesari *et al.*, 2003; Rasmussen

et al., 2017). A hereditariedade consiste em um importante fator de risco associado ao desenvolvimento de CO, sendo que ~10% dos casos apresentam componentes familiares (Childers *et al.*, 2018).

Em relação aos fatores genéticos, há associação entre o CO e a ocorrência de variantes nos genes:

- *BRCA1* (do inglês, *BRCA1, DNA repair associated*) e *BRCA2* (do inglês, *BRCA2, DNA repair associated*), que correspondem entre 30 e 15% dos casos de CO, respectivamente (Couch *et al.*, 2013);
- *TP53* (do inglês, *tumor protein p53*), mutações e perda de função neste gene são observadas em até 80% dos casos esporádicos e familiares de CO;
- *PTEN* (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*), são encontradas alterações neste gene em 3 a 8% dos casos, geralmente em tumores de baixo grau (Bast *et al.*, 2009);
- *MLH1*(do inglês, *mutL homolog 1*), envolvido também no desenvolvimento do câncer colorretal não-poliposo (Xiao *et al.*, 2014);
- *PRKN* (do inglês, *parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*), há evidências de que este gene poderia atuar como um supressor tumoral em algumas linhagens de CO (Cesari *et al.*, 2003) e alterar a suscetibilidade ao CO (Klimczak *et al.*, 2016);
- *HTRA1* (do inglês, *HtrA serine peptidase 1*), sua expressão elevada contribui para uma melhor resposta tumoral à quimioterapia em CO (Chien *et al.*, 2013);
- e algumas mutações nos genes *RAD51D* (do inglês, *RAD51 paralog D*) e *BRIP1* (do inglês, *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*) levam ao aumento do risco de 6 e 8 vezes, respectivamente, para o desenvolvimento de CO (Rafnar *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015).

1.2 Os tumores epiteliais de ovário

Os tumores epiteliais de ovário podem ser classificados em tumores mucinosos, endometrióides, de células claras, de Brenner, serosos e indiferenciados (Tabela 3) (WHO, 2019). Os serosos ocorrem em até 80% dos casos e são os mais incidentes (Kossaï *et al.*, 2017).

Tabela 3. Classificações dos tumores epiteliais de ovário.

Tumores epiteliais de ovário			
	Benigno	Borderline	Maligno
Serosos	Cistoadenoma seroso Adenofibroma seroso Papiloma seroso	<i>Borderline</i> seroso <i>Borderline</i> seroso micropapilar	Carcinoma seroso baixo grau Carcinoma seroso alto grau
Mucinosos	Cistoadenoma mucinoso Adenofibroma mucinoso	<i>Borderline</i> mucinoso	Carcinoma mucinoso
Endometrióides	Cisto endometrióide Cistoadenoma endometrióide Adenofibroma endometrióide	Endometrióide <i>borderline</i>	Carcinoma endometrióide
Células claras	Cistoadenoma de células claras Adenofibroma de células claras	Tumor de células claras <i>borderline</i>	Carcinoma de células claras
Brenner	Tumor de Brenner	Tumor de Brenner <i>borderline</i>	Tumor de Brenner maligno
Indiferenciados			

Adaptado de: American Cancer Society, 2018; World Health Organization, 2014

Os carcinomas serosos de baixo grau desenvolvem-se a partir de lesões observadas na sequência cistoadenoma seroso, seroso *borderline* e adenocarcinoma seroso de baixo grau (Cuello *et al.*, 2018).

Os cistoadenomas são tumores benignos de ovário que geralmente não se disseminam, apesar de serem diagnosticados apresentando grandes volumes devido ao seu comportamento assintomático. Contudo, devido a fatores ainda desconhecidos, este subtipo tumoral pode sofrer transformações que proporcionam sua malignização (Hauptmann *et al.*, 2017).

Os serosos *borderline* são considerados tumores de baixo potencial de malignidade e compõem cerca de 10 a 20% dos casos de tumores epiteliais serosos de ovário. Eles crescem lentamente, apresentam proliferação celular maior do que a encontrada em tumores benignos e acometem pacientes mais jovens, a maioria em pré-menopausa, o que gera diversos questionamentos sobre a preservação da fertilidade destas pacientes. Quando seu diagnóstico é precoce, as pacientes apresentam sobrevida global de 90%. Em geral, os serosos *borderline* manifestam

bom prognóstico, entretanto, em alguns casos podem desenvolver disseminação além do ovário (Capriglione *et al.*, 2017).

Assim como nos carcinomas, os implantes tumorais dos serosos *borderline* acometem a cavidade peritoneal, podendo ser classificados em invasivos ou não-invasivos. Desta forma, a diferenciação dos tumores *borderline* e adenocarcinomas só pode ser realizada pelas características dos tumores primários.

Os adenocarcinomas serosos de baixo grau de ovário podem ser bilaterais em até 25% dos casos (Capriglione *et al.*, 2017) possuem crescimento consideravelmente mais lento e são, geralmente, diagnosticados em pacientes em idades mais jovens quando comparadas aos tumores serosos de alto grau. Respondem bem a tratamentos hormonais, porém, tendem a ser, resistentes à terapia convencional (Shih e Kurman, 2004).

Os carcinomas serosos de alto grau correspondem a até 85% dos casos de tumores epiteliais serosos, costumam ser diagnosticados em estádios avançados da doença, possuem boa resposta à quimioterapia tradicional, mas são menos responsivos a tratamentos hormonais (Romero *et al.*, 2012). Nestes carcinomas de alto grau, são observadas elevadas proliferação celular e metástase. Geralmente acometem pacientes acima dos 50 anos e apresentam mutações em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, resultando em uma superexpressão das proteínas codificadas por estes genes (Kossai *et al.*, 2017).

Os carcinomas serosos de baixo e alto graus eram descritos tendo origem no mesmo tipo de lesão precursora, todavia a origem dos serosos de alto grau tem sido crescentemente associada a lesões precursoras das trompas de falópio, especialmente na sua região distal, a superfície das fimbrias (Zhou *et al.*, 2019). Esta região, exposta à cavidade pélvica, tem sido proposta como possuindo importante papel na promoção da carcinogênese ovariana (Mallen *et al.*, 2018; Corzo *et al.*, 2016 e 2017; Walsh *et al.*, 2011). A partir destas estruturas superficiais das trompas, algumas mutações, como a do gene *TP53*, podem vir a acarretar a expansão clonal de células epiteliais, processo atualmente denominado “*p53 signature*”. Por meio deste processo, as células são capazes de adquirir capacidade proliferativa, dando origem ao carcinoma intraepitelial tubário (do inglês *Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma (STIC)*), impulsionando células cancerígenas pelas fimbrias e implantando-se pela superfície do ovário (Mallen *et al.*, 2018).

Uma busca crescente por fatores moleculares e genéticos relacionados à origem e ao desenvolvimento de tumores ovarianos é evidente, inclui o estudo de alterações nas trompas de Falópio e visa uma detecção precoce da doença e aumento das taxas de sobrevivência global para o COE (Webb & Jordan, 2017).

1.3 As proteínas Parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 em tumores de ovário

1.3.1 Parkina

A proteína parkina é produto do gene *PRKN* (*parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*), originalmente denominado *PARK2* ou em suas nomenclaturas menos conhecidas *PDJ*, *AR-JP* e *LPRS2* e que se localiza em 6q25.2-q27 (NCBI, 2019).

O gene *PRKN* é um dos maiores genes humanos, abrange mais de 1380kb e possui 12 éxons (NCBI, 2019), sendo expresso em diversos tecidos, como rins, cérebro, testículos e pulmões (NCBI, 2019; Pouligiannis *et al.*, 2009). Em tecidos ovarianos, a expressão da proteína parkina é baixa e em sua maioria observada no citoplasma celular, mas pode também ser encontrada em núcleos celulares (Figura 4) (The Human Protein Atlas, 2019).

PRKN está na região cromossômica FRA6E, um sítio frágil comum do genoma, sendo seus exons 2 a 8 localizados no centro de fragilidade (Abumrad *et al.*, 2011). Os sítios frágeis são considerados *hotspots* para deleções, ampliações e mutações devido a sua instabilidade (Duan *et al.*, 2019). Tumores de ovário, pulmão e glioblastomas já foram descritos com alterações na região FRA6E (Duan *et al.*, 2019; Abumrad *et al.*, 2011; Veeriah *et al.*, 2010; Denison *et al.*, 2003; Cesari *et al.*, 2003).

Ainda, a perda de heterozigosidade do *PRKN* tem sido amplamente associada ao desenvolvimento ou progressão do câncer, devido à inativação ou redução da expressão deste gene. Desta forma, *PRKN* também é apontado como um importante supressor tumoral, visto que sua deficiência ou inativação está associada a contribuição para a formação de tumores (Duan *et al.*, 2019).

Em tumores de mama, a metilação de *PRKN* foi relacionada à diminuição das taxas de sobrevivência. Da mesma forma, sua metilação aberrante já foi identificada no desenvolvimento de leucemia linfóide aguda, leucemia granulocítica crônica (Agirre *et al.*, 2006), carcinoma nasofaríngeo (Ni *et al.*, 2017) e câncer cervical (Naseem *et*

al., 2017). Ademais, a regulação negativa de *PRKN* foi associada à promoção de uma variedade de tumores. Análises sugerem que a perda de expressão de *PRKN* poderia ser utilizada como marcador de prognósticos para sobrevivência no câncer de mama (Wahabi *et al.*, 2019). Apesar das atuais evidências sobre a expressão de *PRKN* para a supressão tumoral, os mecanismos moleculares pelos quais este gene pode apresentar regulação negativa ainda permanecem incertos (Bhat *et al.*, 2019).

As alterações de *PRKN* no câncer de ovário ainda não estão completamente descritas. Atualmente, uma das principais atividades desempenhadas por parkina na promoção e progressão do câncer de ovário está associada à ubiquitinação de substratos mediada por esta proteína (Aguilar-Hernández *et al.*, 2013).

A parkina possui 465 aminoácidos e um domínio C-terminal UBL e um N-terminal RING-IBR-RING, sendo uma E3 ubiquitina ligase (Feng *et al.*, 2019).

A ubiquitinação consiste na sinalização de substratos pela ligação covalente de moléculas de ubiquitina (Ub) e está relacionada a diversos processos celulares, como o controle do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA danificado, podendo acarretar a ativação ou inativação do substrato marcado, ocasionando alterações de função ou localização e degradação (Aguilar-Hernández *et al.*, 2013).

Ocorre pela ligação entre um resíduo de lisina do substrato alvo e um resíduo de glicina C-terminal da ubiquitina. Esta ligação envolve três enzimas: E1 – ativadora de Ub, responsável pela adenilação da extremidade C-terminal da Ub e sua ativação; E2 – conjugadora de Ub, que permite a aproximação entre a Ub ativada e o substrato; e E3 – Ub ligase, que catalisa a ligação isopeptídica na extremidade C-terminal da Ub (Senft *et al.*, 2018). As E2 e especialmente as E3 conferem especificidade ao processo.

As E3 podem apresentar 4 domínios diferentes: HECT (Homologous to E6-accessory protein Carboxy Terminus), RING finger (Really Interesting New Gene), U-box e RBR (RING in between RING). Este último está presente na parkina.

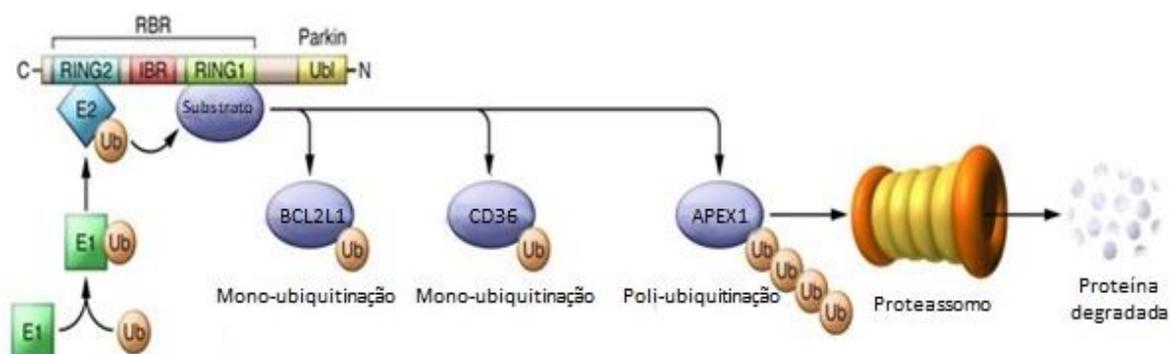
A ubiquitinação se apresenta de três formas distintas: monoubiquitinação, poliubiquitinação e multiubiquitinação. A monoubiquitinação é a ligação de uma única Ub ao substrato alvo, gerando a sinalização deste sem que seja degradado. Esta marcação pode ocasionar mudanças de atividade ou localização do substrato marcado. A poliubiquitinação consiste na adição de uma cadeia de Ub ao substrato alvo, sinalizando via K48 a sua degradação no proteassomo 26S (Figura 3). Como na monoubiquitinação, a multiubiquitinação é caracterizada pela ligação de uma única

Ub, porém em várias regiões do substrato, ocasionando diferentes sinais (Senft *et al.*, 2018; Abumrad *et al.*, 2011).

A ubiquitinação mediada por parkina pode ocorrer em diferentes lisinas, e sinaliza para a degradação proteossomal do substrato pela ligação com K48, ou K63 para marcação do substrato com estabilização e otimização do tráfego celular (Senft *et al.*, 2018). A parkina também é capaz de se autoubiquitar, promovendo a sua própria regulação (Abumrad *et al.*, 2011).

Mutações em *PRKN* podem levar à perda de função da parkina, o que conseqüentemente pode alterar a ubiquitinação de seus substratos (Duan *et al.*, 2019). A parkina possui diferentes alvos de ubiquitinação, por exemplo as ciclinas D e E, o acúmulo destas proteínas está relacionado à perda de função de parkina e conseqüente promoção tumoral (Duan *et al.*, 2019).

Figura 3. Processo de ubiquitinação realizado por parkina em seus substratos BCL2L1, CD36 e APEX1.



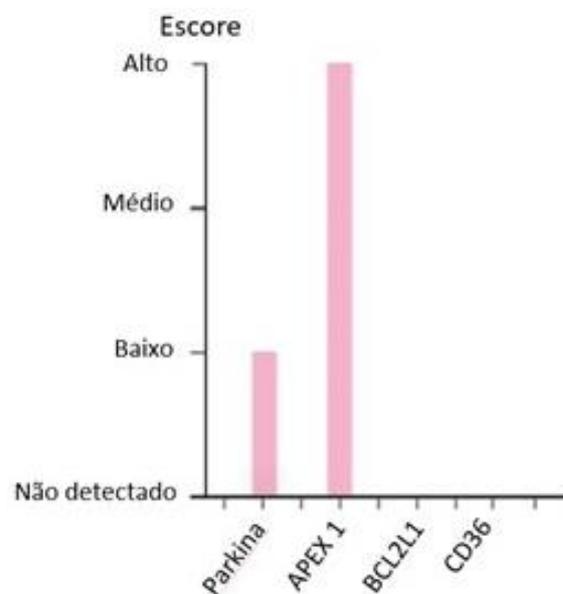
Fonte: Adaptado de J Clin Invest, 2011.

A parkina também exerce um papel crucial na mitofagia, que consiste na eliminação de mitocôndrias danificadas e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*). Este processo depende da fosforilação de PINK1 (*PTEN induced kinase 1*) e conseqüente ativação de parkina, através do seu recrutamento do citoplasma para a superfície mitocondrial, facilitando a ubiquitinação de proteínas alvo e evitando o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e alguns tumores (Scott *et al.*, 2016). Mutações e perda de função de parkina podem prejudicar a mitofagia e resultam no acúmulo de mitocôndrias danificadas, o que já foi descrito na contribuição do desenvolvimento da doença de Parkinson (Senft *et al.*, 2018).

Entre outros processos, através da sua função de ubiquitinação, a parkina também pode participar na regulação do metabolismo energético, através do efeito *Warburg*, regulação do metabolismo de lipídios (Seo *et al.*, 2011), modulação do ciclo celular, ativação de proteínas anti-apoptóticas (Gong *et al.*, 2017), homeostase e sobrevivência celular (Scott *et al.*, 2016).

Esta proteína tem sido investigada por nosso grupo de pesquisa no que se refere ao seu papel em diferentes tumores. Os perfis de expressão imunohistoquímica de parkina foram preliminarmente avaliados em tumores de ovário no escopo de um projeto de iniciação científica (Cabral *et al.*, 2017). Inicialmente foram descritos tag SNPs de susceptibilidade de *PRKN* para o câncer epitelial de ovário (Klimczak *et al.*, 2016). Em adenocarcinoma colorretal, foram encontrados resultados correlacionando a expressão mais elevada de parkina em camadas profundas de tumores em estádios avançados e a sobrevida aumentada de um subgrupo de pacientes (da Silva-Camargo *et al.*, 2018). Ainda, a investigação de parkina tem sido realizada em meduloblastoma, neuroblastoma, nefroblastoma e astrocitoma pediátricos (submetidos para publicação).

Figura 4: Expressão das proteínas parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 em tecidos ovarianos não-neoplásicos.



Fonte: Adaptado de The Human Protein Atlas, 2019.

1.3.2 APEX1

A proteína APEX1 é codificada pelo gene *APEX1* (*Apurinic/apirimidinic endodeoxyribonuclease 1*) também conhecido como *APE*, *APE1*, *HAP1* ou *REF1*. Este gene se localiza em 14q11.2, possui cerca de 3kb e é composto por 5 éxons (NCBI, 2019; Wen, *et al.*, 2016).

A função mais conhecida desta proteína consiste no seu papel como endonuclease AP (apurínica/apirimidínica), exercido por seu domínio C-terminal, reparando tanto o DNA nuclear quanto mitocondrial e contribuindo para estabilidade genômica (Illuzzi *et al.*, 2017). Desta forma, a APEX1 é essencial no reparo pela excisão de bases (REB), reconhecendo sítios do DNA que foram danificados pela ação do estresse oxidativo, agentes alquilantes, exposição à radiação ionizante e agentes quimioterápicos, como bleomicinas e cisplatinas (Wen *et al.*, 2016; Londero *et al.*, 2014).

Outra função de APEX1 está relacionada ao seu domínio N-terminal, que desenvolve atua na regulação da expressão de fatores de transcrição redox, relacionados a promoção e progressão de câncer, como *TP53*, *HIF-1 α* (*hypoxia inducible factor 1*) e NF- κ B (nuclear factor kappa B subunit 1), com importante papel em diversos processos inflamatórios (Wen *et al.*, 2016; Londero *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstraram que a expressão aumentada de APEX1 está relacionada à quimiorresistência em diversos tipos de câncer, como os hepáticos, de próstata e de pulmão (Wang *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2018; Juhnke *et al.*, 2017). Em relação ao CO, além da quimioresistência, a investigação de APEX1 está principalmente relacionada a recorrência tumoral, sobretudo, em pacientes em estádios III e IV, onde o estudo de moléculas reparadoras da quebra de DNA torna-se ainda mais relevante (Wen *et al.*, 2016). Em tecidos ovarianos normais, esta proteína possui expressão elevada e predominantemente nuclear (Figura 4) (The Human Protein Atlas, 2019). Entretanto, a expressão de APEX1 pode variar de acordo com diferentes tecidos tumorais, sendo também encontrada no citoplasma (Fritz *et al.*, 2000) ou mitocôndrias (Chattopadhyay *et al.*, 2006).

Em 2016, Scott e colaboradores investigaram a relação entre parkina, PINK1 e APEX1 em glioblastomas, buscando descrevê-la pela primeira vez em tumores

através da ubiquitinação promovida pela parkina. Foram observadas as expressões de parkina e APEX1 em tecidos neoplásicos e não neoplásicos, e os tecidos cancerígenos demonstraram elevada expressão de APEX1, enquanto a expressão de parkina foi reduzida. Por outro lado, a expressão de parkina foi significativamente mais elevada em tecidos não tumorais quando comparada às amostras de glioblastomas. Os autores descrevem ainda uma relação inversa entre a expressão de parkina e APEX1 e que a perda de parkina e o aumento nos níveis de APEX1 estão diretamente associados a tumorigênese de glioblastomas. Ainda, o estudo identificou mono e poliubiquitinação realizada em APEX1 pela parkina, variando de acordo com a localização das duas proteínas (Scott *et al.*, 2016).

1.3.3 BCL2L1

A proteína BCL2L1, também conhecida como BCL-XL, é codificada pelo gene *BCL2L1 (BCL2 like 1 [Homo sapiens (human)])* localizado em 20q11.21 (NCBI, 2019). Esta proteína pertence à família das proteínas BCL-2, composta por hetero ou homodímeros que atuam como reguladores anti ou pró-apoptóticos, sendo classificados em três grupos de proteínas estruturalmente relacionadas: *pro-survival BCL-2 like proteins*, o grupo anti-apoptótico desta família proteica e no qual se enquadra a proteína BCL2L1; *multi BH-domain pro-apoptotic BAX/BAK proteins* e *pro-apoptotic BH3-only proteins* (Delbridge & Strasser, 2015).

A BCL2L1, assim como o restante das proteínas do seu grupo, localiza-se na membrana mitocondrial externa e possui uma ação antiapoptótica, que consiste na prevenção da ativação de BAX (BCL2 associated X, apoptosis regulator) e BAK (BCL2 antagonist/killer 1), que por sua vez, são pertencentes à família das proteínas pró-apoptóticas. Esta ação antiapoptótica, protege a integridade da membrana mitocondrial externa, prevenindo sua permeabilização a moléculas pró-apoptóticas responsáveis pela ativação da cascata de caspases e, dessa maneira, prevenindo a destruição celular (Delbridge e Strasser, 2015). Portanto, sua principal ação em tumores consiste na prevenção da morte celular programada, viabilizando a sobrevivência tumoral (Kafara *et al.*, 2015).

A BCL2L1 tem demonstrado uma superexpressão em tumores de ovário recorrentes e quimiorresistentes (Yokoyama *et al.*, 2017). Alguns estudos apontam

que a desregulação da apoptose pode ser um dos principais contribuintes para a resistência a drogas, deste modo, as proteínas da família BCL-2 tornaram-se alvos atraentes na investigação de novas terapia para o CO (Cardenas *et al.*, 2017; Abed *et al.*, 2016). Em ovários não-neoplásicos, BCL2L1 apresenta expressão baixa e citoplasmática (Figura 4) (The Human Protein Atlas, 2019).

A amplificação do gene *BCL2L1* vem sendo analisada em diversos tipos de tumores, tais como, pulmão, mama, pâncreas e linfomas (Merino *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2017) Gong e colaboradores (2017), apontam que o gene *PRKN* pode ser considerado um importante regulador da morte celular programada devido ao seu papel na manutenção da integridade e função mitocondrial, podendo interferir na estabilidade de BCL2L1, através da mono-ubiquitinação realizada pela parkina, modulando, assim, a apoptose. Diante disso, uma disfunção na expressão de parkina pode vir a causar uma superexpressão de proteínas anti-apoptóticas no câncer (Gong *et al.*, 2017).

1.3.4 CD36

CD36 é uma proteína codificada pelo gene de mesmo nome, *CD36* (*CD36 molecule*), localizado na região cromossômica 7q21.11. Esta proteína é um receptor de superfície envolvido em diversos processos biológicos (Pascual *et al.*, 2017), especialmente no metabolismo de lipídios, participando do seu transporte do meio extracelular para o intracelular e permitindo a produção de ATP pela oxidação de lipídios (Zhao *et al.*, 2017). Encontrada em células epiteliais tubulares, macrófagos, células endoteliais e adipócitos, CD36 atua como receptor de trombospondina em plaquetas (Jung *et al.*, 2018). No contexto da biologia tumoral, esta proteína foi proposta como um marcador de malignidade, sendo observada uma correlação negativa entre a sua expressão e o prognóstico de pacientes com glioblastoma (Hale *et al.*, 2014). CD36 também está associado à apresentação de antígenos, ao transporte de ácidos graxos de cadeia longa, à geração de radicais livres e à angiogênese, aumentando a capacidade metastática das neoplasias (Nipin *et al.*, 2018). Devido à dependência das metástases observadas em câncer de mama, bexiga e pulmão, além daquelas em melanoma, de CD36, esta proteína tem sido

considerada um marcador de metástase. No CO, as células comumente metastizam para o tecido adiposo (Cuello *et al.*, 2018).

Ladanyi e colaboradores (2018), observaram em modelos *in vivo* e *in vitro* que os adipócitos são capazes de promover o crescimento do CO através do fornecimento de ácidos graxos e que isto poderia estar relacionado a uma regulação positiva de CD36. O que talvez possa ser explicado por CD36 ser um receptor de membrana que facilita o processo de transporte e captação de ácidos graxos, viabilizando a captação de colesterol e regulando o direcionamento metabólico dos mesmos. Os autores acreditam que adipócitos localizados no omento possam induzir a expressão de CD36 em células cancerígenas ovarianas, promovendo a captação de ácidos graxos. Além disso, sugere-se que, na obesidade, a vascularização e o transporte lipídico aumentados possam promover uma maior capacidade proliferativa tumoral (Ladanyi *et al.*, 2018).

A expressão desta proteína em tecidos ovarianos não-neoplásicos é baixa (Figura 4), sendo prevalentemente citoplasmática (The Human Protein Atlas, 2019).

Uma ampla função de parkina diante da regulação do metabolismo de ácidos graxos tem sido descrita. Seo e colaboradores (2011) demonstraram em seus estudos que a parkina é capaz de modular a captação de lipídeos através da mono-ubiquitinação de CD36, resultando na translocação da proteína para membrana plasmática e sua consequente estabilização (Seo *et al.*, 2011; Abumrad *et al.*, 2011).

JUSTIFICATIVA

A atenção voltada para tumores epiteliais serosos de ovário justifica-se, além de resultados preliminares obtidos anteriormente (Cabral *et al.*, 2017), pelo número de pacientes acometidas. O câncer de ovário é a principal causa de morte entre as mulheres quando são consideradas neoplasias ginecológicas e os tumores epiteliais serosos representam ~80% dos casos totais (Capriglione *et al.*, 2017).

Os tumores epiteliais serosos se originam a partir de diferentes lesões, sendo também classificados em subtipos distintos: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma. Características referentes ao subtipo *borderline* permanecem como temas de intensa discussão. Apesar do seu baixo potencial de malignidade, a abordagem atualmente empregada para este subtipo tumoral, considera a retirada do(s) ovário(s) acometido(s), visando a precaução de uma possível progressão tumoral e consequente evolução para o adenocarcinoma ovariano. Ainda, nos casos em que não é possível concluir o subtipo histológicos e/ou há evidências de invasão, é considerada a retirada de outras estruturas ginecológicas, como trompas de Falópio e útero, com o objetivo de prevenir uma implantação tumoral para outras regiões (Colombo *et al.*, 2019; Hauptmann *et al.*, 2017).

A identificação de marcadores que auxiliem na decisão da abordagem e compreensão de diferentes subtipos histológicos de tumores de ovário poderá contribuir para o refinamento do diagnóstico e prognóstico, auxiliando na escolha de tratamentos mais específicos e eficazes, além de proporcionar uma melhor caracterização da neoplasia, de seus subtipos específicos e da estratificação de seus riscos, evitando métodos agressivos de abordagem e consequentes hospitalizações, o que poderá favorecer a preservação da fertilidade em mulheres mais jovens.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo o estudo de proteínas reguladas pela parkina através da sua atividade como E3-Ub ligase e com funções relevantes em câncer. Embora diversos estudos já estejam sendo realizados, o papel de proteínas-alvo da parkina envolvidas na manutenção do ciclo celular, no reparo do DNA, resistência à apoptose e progressão do câncer ovariano ainda não se encontram completamente elucidados. Desta forma, a avaliação do perfil de expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 poderá contribuir para a uma melhor compreensão desta neoplasia e de sua diferenciação tumoral, bem como oferecer dados que esclareçam o papel e possível relação destas proteínas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 nos subtipos histológicos de tumor epitelial seroso de ovário: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma, com o objetivo de prospectar novos marcadores tumorais que possam ser empregados na estratificação de riscos, na indicação de prognóstico e de manejo das pacientes, além de auxiliar na caracterização destes subtipos.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas BCL2L1 e CD36 nos subtipos histológicos de tumor epitelial seroso de ovário: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma;

b) Comparar os perfis de expressão imunoistoquímica de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 nos subtipos histológicos de tumor epitelial seroso de ovário: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras estudadas

As amostras incluídas neste estudo (Figura 5) foram obtidas dos serviços de patologia de três hospitais de Curitiba, Paraná, sendo eles Hospital Santa Cruz, Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Erasto Gaertner, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (2.022.676) (Anexo A), do Hospital Erasto Gaertner (2.281.168) (Anexo B) e do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (2.131.666) (Anexo C).

A partir dos prontuários eletrônicos registrados entre 2012 e 2018 nos dois primeiros hospitais citados foram selecionados todos os casos com diagnóstico anatomopatológico de tumor epitelial seroso de ovário dos seguintes subtipos: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma, cujas amostras foram obtidas durante cirurgia para retirada de tumor primário de ovário de pacientes que não haviam sido submetidas à quimioterapia ou radioterapia neoadjuvantes. O diagnóstico anatomopatológico e a idade ao diagnóstico das pacientes foram coletados diretamente destes prontuários, sob a supervisão dos médicos responsáveis. Os casos cujas amostras não foram localizadas ou não apresentaram qualidade suficiente para a análise imunoistoquímica foram excluídos do estudo. Da mesma forma e nas mesmas condições, foram incluídas 7 amostras derivadas das pacientes do Hospital Erasto Gaertner analisadas por Klimczak e colaboradores (2016).

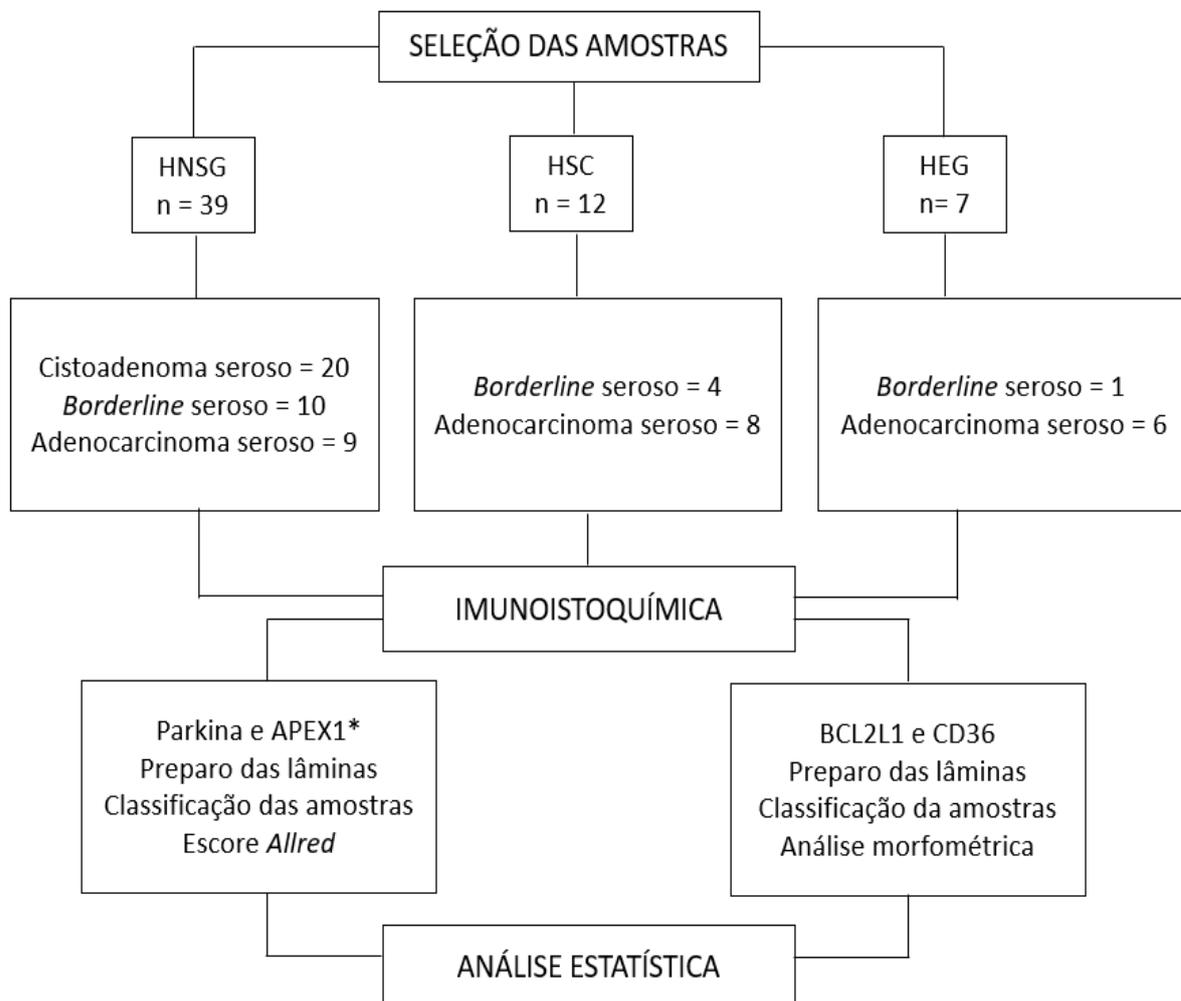
Assim, foram obtidas 97 amostras que tiveram sua classificação histológica reavaliada para confirmação, sendo 59 cistoadenomas, 15 *borderline* e 23 adenocarcinomas.

As características teciduais destas amostras inviabilizaram sua inclusão em TMA (*Tissue Microarray*), técnica que permitiria a alocação de aproximadamente 30 casos por lâmina, tornando obrigatório o exame de cada amostra em lâmina individual e aumentando sobremaneira os custos e a duração do estudo. Assim, 20 amostras de cistoadenoma foram selecionadas aleatoriamente para representar este subtipo nas análises propostas, e as outras 39 foram excluídas. Portanto, as amostras analisadas foram 58.

Como controles técnicos, foram obtidas, quando possível, amostras do outro ovário da mesma paciente, livre de neoplasia, retirado no momento da cirurgia.

Alternativamente foram obtidas amostras de ovários não-neoplásicos, retirados por ooforectomia, em cirurgias sem relação com prevenção do câncer.

Figura 5: Seleção das amostras e desenvolvimento da pesquisa.



Legenda: n = número de casos; HNSG = Hospital Nossa Senhora das Graças; HSC = Hospital Santa Cruz; HEG = Hospital Erasto Gaertner. *Os dados referentes à expressão de parkina e APEX1 são provenientes de Klimczak *et al.*, 2019, em preparação.

4.2 Preparo das lâminas histológicas

A partir dos blocos de parafina contendo as amostras dos tumores epiteliais de ovário foram realizados cortes histológicos sequenciais de 4µm com a utilização de uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e uma lâmina cortante (Marienfeld), para confecção de lâminas que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) (Biotec®).

Estas lâminas foram sequencialmente analisadas em microscópio óptico para revisão quanto à sua classificação histológica. Este processo foi realizado com o auxílio de uma médica patologista.

Para tanto, foi realizada a desparafinação pela imersão das lâminas com os cortes histológicos a serem analisados em xilol (*Biotec*®), a 37°C, por 5 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. A reidratação das amostras foi a etapa seguinte, quando as lâminas foram banhadas 3 vezes em álcool absoluto (*Alphatec*®) por 1 minuto e depois mergulhadas em água por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram submersas em hematoxilina pelo período de 8 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos e submersas em eosina por 3 minutos. Então, foram submetidas sucessivamente a banho em álcool 95% por 1 minuto, álcool absoluto por 3 vezes de 1 minuto e xilol (*Biotec*®) por 3 vezes de 1 minuto. Para montagem das lâminas foi utilizada a resina adesiva Histolam (Entellan, *Merck*®).

4.3 Imunoistoquímica

A desparafinação das lâminas confeccionadas para imunoistoquímica foi realizada pela imersão das lâminas contendo o material a ser analisado em xilol (*Biotec*®), à temperatura ambiente (20°C), por 10 minutos. Este procedimento foi repetido 2 vezes. A seguir, as lâminas foram submetidas a 3 banhos sucessivos de 1 minuto em álcool etílico absoluto (*Alphatec*®) e de 1 minuto em álcool etílico 80%. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de H₂O₂ 5%. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram mergulhadas em recuperador *Imuno Retrifer*® (Reveal™) e incubadas em banho-maria, a 99°C, por 25 minutos. Depois, foram resfriadas até a temperatura ambiente (20°C), submetidas à nova lavagem em água destilada e secas levemente com papel absorvente. Cada amostra foi marcada com caneta hidrofóbica para a delimitação do corte. Estas lâminas foram mantidas em tampão TBS Tris pH 7,3 (50mM Tris-Cl, 150mM NaCl).

A seguir, as lâminas foram incubadas separadamente com os anticorpos específicos em câmara úmida, em temperatura entre 2 e 8°C, durante a noite. A diluição do anticorpo específico para parkina (Anti-Parkin antibody [PRK8] Abcam #ab77924) foi de 1:100, APEX1 (Anti-APE1 antibody Abcam #ab105081) foi de

1:1000, BCL2L1 (Anti-BCL2L1 antibody Abcam #ab45002) foi de 1:1000 e para CD36 (Anti-CD36 antibody Abcam #ab78054) de 1:1000. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão TBS Tris pH 7.3 e secas. A seguir, foi adicionado o reagente *Spring Reveal Complement*® (*Reveal*™) e as lâminas foram mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente (20°C). Este processo foi repetido para o reagente *Spring Reveal Conjugate*® (*Reveal*™), por 15 minutos.

Para a revelação, o complexo DAB (*Kit Spring*® *Reveal*™) foi acrescentado sobre as lâminas. A contracoloração foi obtida pela imersão das lâminas em solução de hematoxilina de Harris, por 3 minutos, seguida de lavagem em água corrente, por 3 minutos. Por fim, foi realizada a desidratação do material em 3 banhos de 1 minuto em álcool etílico absoluto, e a sua clarificação em 3 banhos de 1 minuto em xilol (*Biotech*®). Para a montagem das lâminas foi usada a resina adesiva Histolam (*Entellan, Merck*®).

Depois da leitura dos controles positivos e negativos nos testes iniciais e certificação de que os anticorpos estavam reagindo, o protocolo de reação descrito foi aplicado no material estudado, sempre pareado com seus respectivos controles positivo e negativo. Os controles positivos são referentes à marcação de tecidos indicados na bula dos anticorpos primários utilizados, com o objetivo de certificar a reação do anticorpo. Assim, como controles positivos para os anticorpos específicos para parkina e APEX1 foram utilizados cortes histológicos de carcinoma de intestino, para BCL2L1 linfonodos e para CD36 artérias lesadas. A omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo da reação.

4.4 Análise morfológica

A análise da expressão das proteínas BCL2L1 e CD36 foi realizada por morfometria, esta técnica permite a descrição quantitativa da área de expressão das proteínas. Assim, a partir das lâminas submetidas à imunoistoquímica foram inicialmente capturadas imagens através do *scanner Axio Scan Z.1*® com as lâminas em objetiva de 40x. Cada amostra gerou de 2.000 a 30.000 fotografias que foram direcionadas para a seleção.

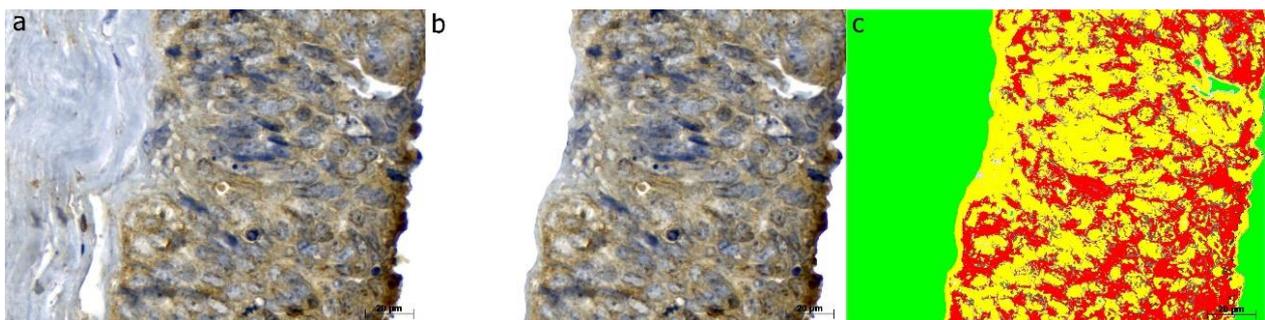
Esta seleção consistiu na exclusão de imagens sem amostras biológicas, de áreas apenas não-neoplásicas e fora do tamanho padrão de 1600x1200. A partir do

conjunto de imagens remanescente, foi estipulado um mínimo de 10 e máximo de 30 fotografias por amostra para cada marcador, totalizando ~2.700 fotografias para a análise morfométrica.

Para otimização das imagens, foi utilizado o software *Adobe Photoshop CS6 v13.0*®. Nesta etapa, foram recortadas as áreas não-neoplásicas e áreas em branco contidas nas imagens selecionadas, restando apenas as áreas contendo células tumorais.

Estas imagens otimizadas foram, então, analisadas por meio do software *Image ProPlus*®, pela ferramenta de morfometria de cores. Foram analisadas três cores: castanho, característica da reação positiva para BCL2L1 e CD36; azul, característica da imunonegatividade; e branca, característica das áreas excluídas. Uma amostra de cada padrão de coloração a ser analisado foi fornecida ao programa, gerando uma máscara vermelha para as áreas em castanho, amarela para as azuis e verde para as brancas. Ao final, o programa forneceu automaticamente os micrômetros quadrados do total das áreas coradas em vermelho (positivas), amarelo (negativas) e verde (excluídas) (Figura 6).

Figura 6. Imagens representativas da execução da análise morfométrica.



Legenda: a. Imagem de uma amostra de adenocarcinoma seroso de ovário corada com anticorpo anti-BCL2L1. b. Imagem otimizada, com a retirada das áreas não-neoplásicas, através do software *Adobe Photoshop CS6 v13.0*®. c. Imagem após a aplicação da máscara morfométrica com marcação por três cores realizada no software *Image ProPlus*. Imagens a-b-c em aumento de 40x.

Em seguida, foi obtido o percentual de área positiva como sendo o total de área positiva (vermelha) em micrômetros quadrados dividido pela sua soma com o total de área negativa (amarela) em micrômetros quadrados, como apresentado na equação:

$$\text{percentual de área positiva por quadrante} = \frac{\text{total de área positiva } (\mu\text{m}^2)}{\text{total de área positiva } (\mu\text{m}^2) + \text{total de área negativa } (\mu\text{m}^2)}$$

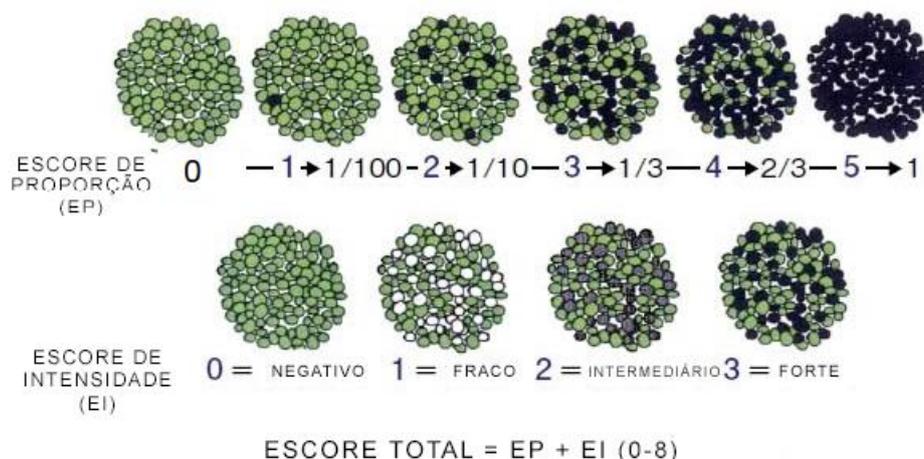
Estes dados foram organizados em uma planilha para serem submetidos à análise estatística.

4.5 Escore de Allred

A análise da expressão da parkina e de APEX1 foi realizada por um único patologista experiente em microscópio óptico BX40 Olympus®. Utilizando-se a objetiva de 40x, foi aplicada uma adaptação do Escore de Allred (Figura 7).

Esta metodologia semiquantitativa consistiu em estabelecer um escore cuja somatória leva em consideração a extensão da área tumoral positiva (citoplasmática ou nuclear) e a intensidade de expressão do marcador em avaliação. Assim, a distribuição (proporção ou quantidade relativa) de citoplasmas ou núcleos marcados foi medida em uma escala variando de 1 a 5, sendo 1 uma proporção de até 1%, 2 de 1 a 10%, 3 de 10 a 33%, 4 de 33 a 66% e 5 maior que 66%. A intensidade da positividade foi medida em uma escala variando de 1 a 3, sendo 0 atribuído para expressões negativas, 1 para fracas, 2 intermediárias e 3 para fortes. O escore final, representado pela soma dos dois anteriores, portanto, podia variar entre 1 e 8 (Qureshi e Perve, 2010).

Figura 7. Método de análise pelo Escore de Allred.



Legenda: Esquema ilustrativo representando a metodologia adaptada para o Escore de Allred. A cor verde identifica as células não coradas para o anticorpo da reação, enquanto as cores cinza, cinza escuro e preto identificam células coradas em diferentes intensidades.

Fonte: Adaptado de Qureshi e Perve, 2010.

4.6 Análise estatística

Os resultados das variáveis quantitativas foram descritos por média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo. Para variáveis categóricas foram apresentados frequências e percentuais. A comparação dos grupos definidos pelo diagnóstico, em relação à idade, foi realizada usando-se o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. Em relação aos marcadores BCL2L1 e CD36, as comparações foram feitas usando-se o modelo de análise de covariância (ANCOVA) incluindo idade como covariável. A análise comparativa dos marcadores parkina e APEX1 foi realizada através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A correlação entre duas variáveis quantitativas foi avaliada estimando-se o coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman. Para analisar a associação entre duas variáveis categóricas foi usado o teste de Qui-quadrado. Para a determinação de ponto de corte que discriminassem a melhor relação entre especificidade e sensibilidade para a expressão de APEX1 associada aos subtipos *borderline* e adenocarcinoma foram ajustadas curva ROC (*receiver operating characteristic*). Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

5. RESULTADOS

5.1 Estatística descritiva das amostras

Foram analisadas amostras de tumores epiteliais serosos de 39 (67,24%) pacientes do Hospital Nossa Senhora das Graças, 12 (20,69%) do Hospital Santa Cruz e 7 (12,07%) do Hospital Erasto Gaertner, totalizando 58 casos. As pacientes estudadas apresentaram média de idade de $49 \pm 15,20$ anos, com idade mínima de 16 e máxima de 77 anos. Conforme a classificação histológica obtida nos prontuários das pacientes e sua revisão por patologista experiente do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, 20 (34,48%) casos foram classificados como cistoadenoma, 15 (25,86%) como *borderline* e 23 (39,66%) como adenocarcinoma. Entre os adenocarcinomas, 9 (15,52%) eram de baixo grau e 12 (20,69%) de alto grau. Destes, 18 (34,62%) casos foram localizados no ovário direito, 16 (30,76%) no ovário esquerdo e 18 (34,62%) eram bilaterais (Tabela 4).

Tabela 4. Dados clínico-patológicos das amostras estudadas

Variável	Resultado*	
classificação histológica dos tumores epiteliais serosos	cistoadenoma	20 (34,48%)
	<i>borderline</i>	15 (25,86%)
	adenocarcinoma	23 (39,66%)
	baixo	9 (15,52%)
	alto	12 (20,69%)
localização do tumor	direita	18 (34,62%)
	esquerda	16 (30,76%)
	bilateral	18 (34,62%)
Hospital	HNSG	39 (67,24%)
	HSC	12 (20,69%)
	HEG	7 (12,07%)
idade ao diagnóstico	$49 \pm 15,20$ (16 – 77)	

Legenda: *Descrito por média (mínimo – máximo) ou frequência (percentual); HNSG: Hospital Nossa Senhora das Graças; HSC: Hospital Santa Cruz; HEG: Hospital Erasto Gaertner.

5.2 Expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas

A expressão de parkina avaliada pelo Escore de Allred apresentou média de 4,80, com valor mínimo de 2 e máximo de 8; enquanto que estes valores para APEX1 foram: média igual a 6,27, com mínimo de 3 e máximo de 8. A análise morfométrica permitiu calcular uma expressão média de $35,69 \pm 22,78$ com um valor mínimo de 0,23 e máximo de 87,88 para BCL2L1 e para CD36 a média foi de $11,34 \pm 11,46$ com um valor mínimo de 0,19 e máximo de 56,23 (Tabela 5).

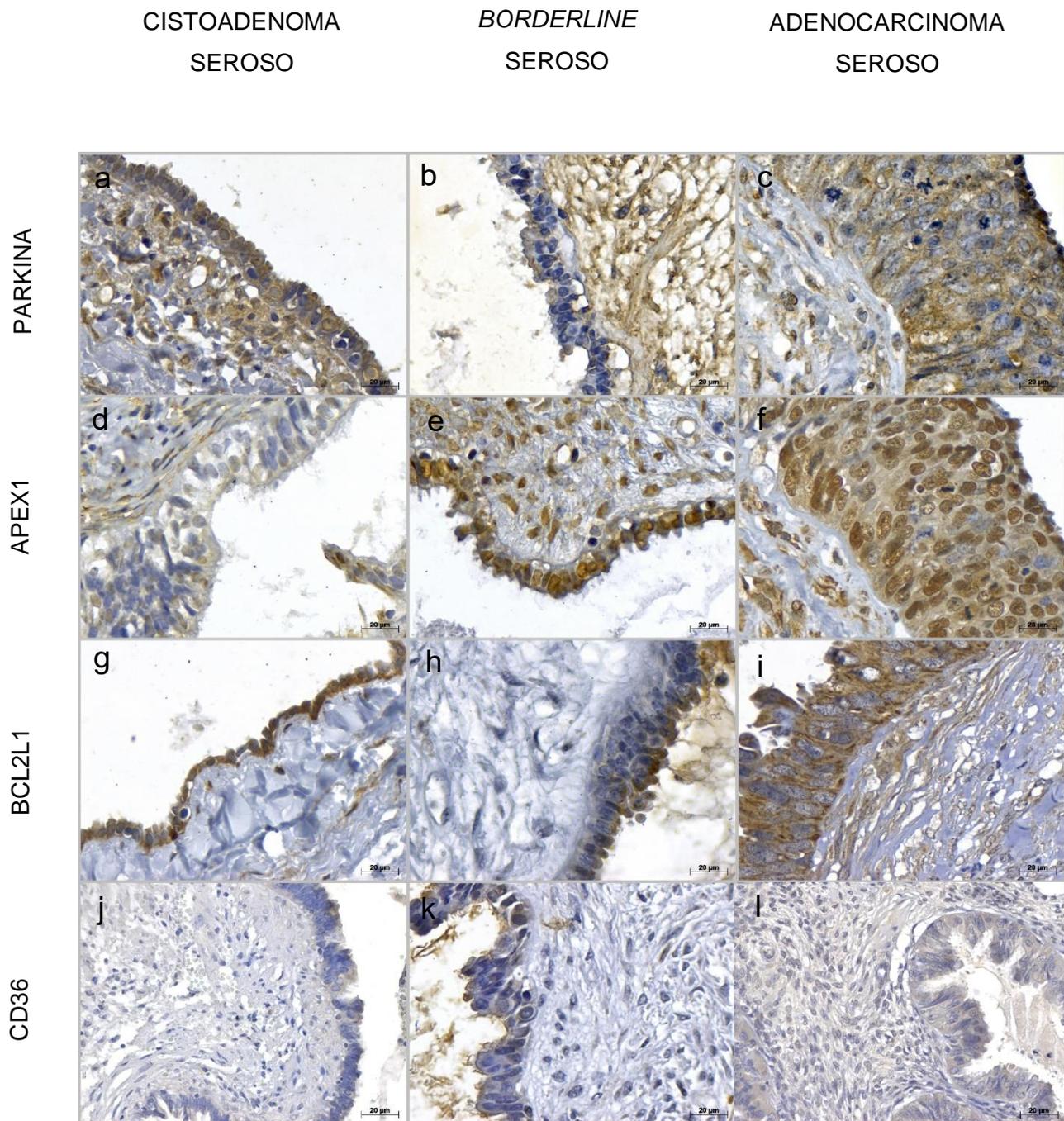
O perfil de expressão destas proteínas pode ser observado na Figura 9, a qual apresenta imagens geradas pelo *scanner Axio Scan Z.1* de lâminas contendo diferentes amostras submetidas à técnica de imunoistoquímica já descrita. Imagens como estas foram otimizadas com o auxílio do *software Adobe Photoshop CS6 v13.0®* para análise apenas da área epitelial. O resultado deste processo de otimização pode ser avaliado na Figura 9 que apresenta imagens que foram usadas na análise morfométrica de BCL2L1 e CD36. As regiões coradas em castanho expressam a proteína avaliada (imunopositividade) e as azuis não a expressam (imunonegatividade).

Tabela 5. Média de expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas.

Proteína	Média de expressão
parkina*	$4,80 \pm 1,67$ (2,00 – 8,00)
APEX1*	$6,27 \pm 1,45$ (3,00 – 8,00)
BCL2L1	$35,69 \pm 22,78$ (0,23 – 87,88)
CD36	$11,34 \pm 11,46$ (0,19 – 56,23)

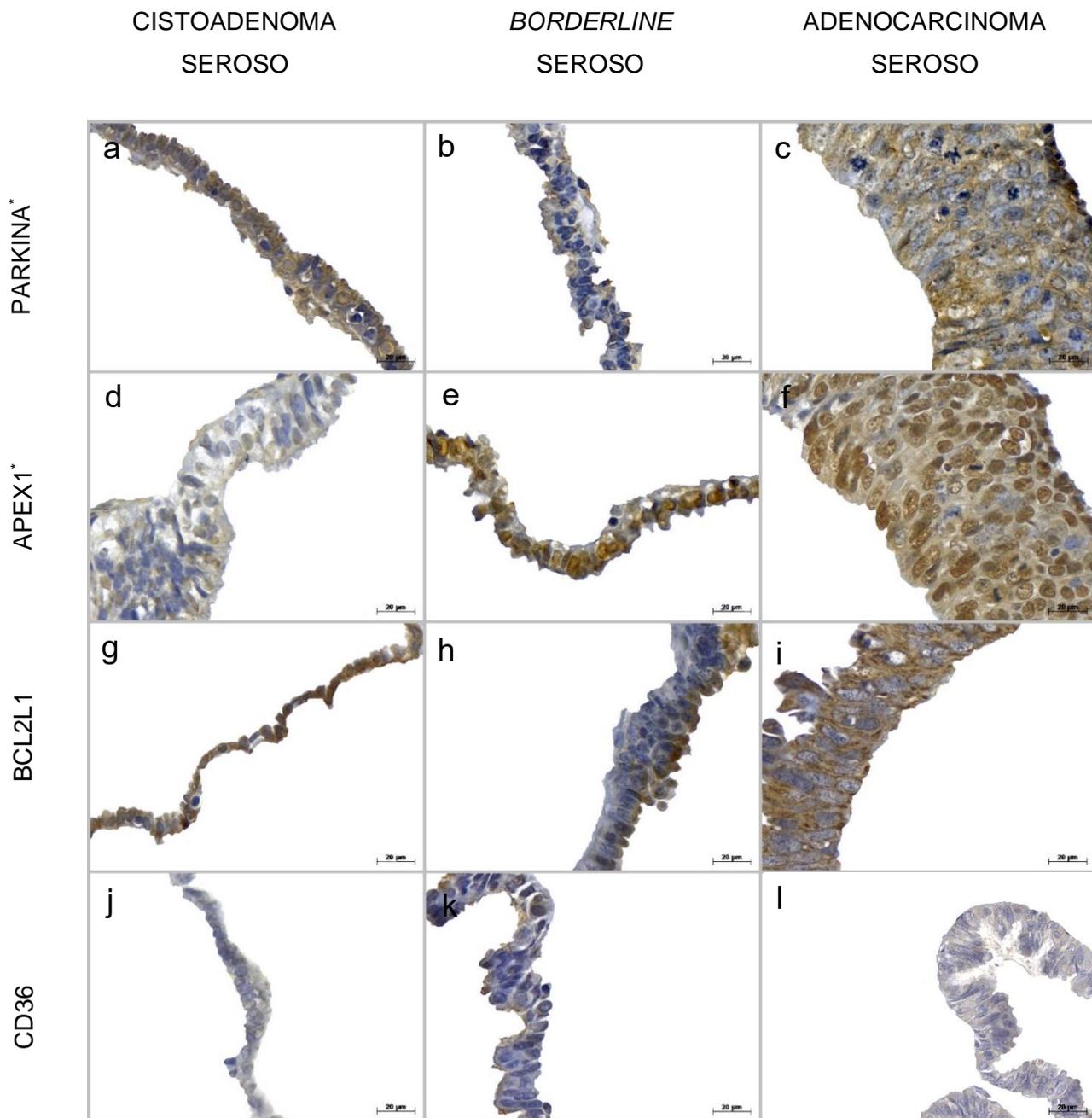
Legenda: *Os dados referentes à expressão de parkina e APEX1 são provenientes do trabalho (Klimczak *et al.*, 2019, em preparação).

Figura 8. Imagens representativas da expressão das proteínas parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 nas amostras de tumores epiteliais serosos de ovário estudadas.



Legenda: Expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 em casos representativos de cistoadenoma seroso (a-d-g-j.), seroso *borderline* (b-e-h-k) e de adenocarcinoma seroso (c-f-i-l). As regiões coradas em castanho expressam a proteína avaliada (imunopositividade) e as azuis não a expressam (imunonegatividade). Aumento de 40x.

Figura 9: Resultados representativos do processo de otimização das imagens e seleção do epitélio com auxílio do *Adobe Photoshop CS6 v13.0®*.



Legenda: Expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 em casos representativos de cistoadenoma seroso (a-d-g-j.), seroso *borderline* (b-e-h-k) e de adenocarcinoma seroso (c-f-i-l). As regiões coradas em castanho expressam a proteína avaliada (imunopositividade) e as azuis não a expressam (imunonegatividade). Aumento de 40x. *Observação:* as imagens referentes a otimização de parkina e APEX1 são apenas para ilustração da área de interesse, visto que estas proteínas foram analisadas por Escore de Allred *

5.3 Análises comparativas, de correlação e de associação

A idade das pacientes no momento do diagnóstico variou entre os subtipos histológicos estudados ($p = 0,002$). Aquelas com cistoadenoma tinham média de idade de $44,5 \pm 20,1$ anos e as com tumor *borderline* apresentaram média de $41,4 \pm 11,6$ anos. As pacientes acometidas com adenocarcinoma apresentaram idade mais avançada, com média de $58,3 \pm 10,1$ (Tabela 6).

Tabela 6. Idade das pacientes de acordo com os subtipos histológicos de tumor epitelial seroso de ovário estudados: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma.

Classificação tumoral	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	<i>p</i>
cistoadenoma	16	44,5	49,0	16	75	20,1	0,002
<i>borderline</i>	15	41,4	41,0	20	64	11,6	
adenocarcinoma	21	58,3	58,0	33	77	10,1	

Legenda: n = número de casos. $p < 0,05$. Observação: não foi possível obter registro da idade de todas as pacientes nos prontuários.

Na Tabela 7, são apresentadas as comparações entre os perfis de expressão das proteínas estudadas e os subtipos de tumores epiteliais serosos analisados.

A expressão de BCL2L1 foi diferente entre os tumores serosos estudados ($p = 0,001$). A média de expressão desta proteína é maior em pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma ($44,0 \pm 22,1$) quando comparada àquelas com cistoadenoma ($23,9 \pm 22,4$) e tumor *borderline* ($28,1 \pm 18,9$). Por outro lado, os perfis de expressão de CD36 foram semelhantes nestes tumores ($p = 0,108$). Os perfis de expressão de BCL2L1 e CD36 foram avaliados por morfometria.

As médias dos Escores de Allred para parkina variaram entre os tumores serosos analisados ($p = 0,001$). A menor média, 3,7, foi observada nos cistoadenomas, enquanto nos tumores *borderline* ela foi de 4,6 e em adenocarcinomas 5,6.

Igualmente variou a expressão de APEX1 ($p = 0,000$), as médias dos Escores de Allred foram de 5,2 nos cistoadenomas, 6,1 nos tumores *borderline* e 7,2 nos adenocarcinomas.

Tabela 7. Comparações entre os perfis de expressão de BCL2L1, CD36, parkina e APEX1 e os subtipos de tumores epiteliais serosos analisados.

Proteína	Classificação tumoral	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	<i>p</i>
Parkina	cistoadenoma	19	3,7	3	2	6	-	0,001
	<i>borderline</i>	15	4,6	4	3	7	-	
	adenocarcinoma	21	5,6	6	3	8	-	
APEX1	cistoadenoma	16	5,2	5	3	8	-	0,000
	<i>borderline</i>	15	6,1	6	5	8	-	
	adenocarcinoma	22	7,2	8	4	8	-	
BCL2L1	cistoadenoma	19	23,9	18,3	0,2	65,7	22,4	0,001
	<i>borderline</i>	14	28,1	27,0	6,8	70,9	18,9	
	adenocarcinoma	22	44,0	42,7	8,0	87,9	22,1	
CD36	cistoadenoma	19	17,8	18,1	1,1	56,2	13,3	0,108
	<i>borderline</i>	15	7,1	3,3	0,3	44,8	10,9	
	adenocarcinoma	22	9,0	5,3	0,0	34,0	9,9	

Legenda: n = número de casos; BCL2L1 e CD36: Análise de Covariância, $p < 0,05$; parkina e APEX1: teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

A expressão dos marcadores também foi avaliada de acordo com a classificação em alto e baixo graus realizada para os casos de adenocarcinoma seroso (Tabela 8). Apenas a proteína APEX1 demonstrou diferença de expressão entre os adenocarcinomas de alto e baixo grau ($p = 0,016$). As proteínas parkina ($p = 0,717$), BCL2L1 ($p = 0,967$) e CD36 ($p = 0,096$) não obtiveram diferença significativa de expressão de acordo com esta classificação.

Tabela 8. Comparação dos marcadores parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 de acordo com o a classificação em alto e baixo grau para adenocarcinomas.

Proteína	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	<i>P</i> *
Parkina	Baixo grau	8	5,8	6	3	8	-	0,717
	Alto grau	11	5,5	6	3	7		
APEX1	Baixo grau	9	6,4	7	4	8	-	0,016
	Alto grau	11	7,7	8	6	8		
BCL2L1	Baixo grau	9	39,8	35,4	13,7	73,5	18,0	0,967
	Alto grau	12	44,8	43,0	8,0	87,9	24,7	
CD36	Baixo grau	9	13,9	8,9	0,8	34,0	11,5	0,096
	Alto grau	11	6,6	4,4	0,0	26,0	7,4	

*Teste t de Student para amostras independentes ou teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$

Para discriminar as variações de expressão observadas, foi conduzido um teste de comparação dois a dois, considerando os tipos tumorais em análise (Tabela 9). Entre cistoadenoma e tumores *borderline*, houve variação de expressão de parkina ($p = 0,049$), APEX1 ($p = 0,040$) e CD36 ($p = 0,022$). Na comparação entre cistoadenoma e adenocarcinoma, variam todas as proteínas estudadas: parkina ($p = 0,000$), APEX1 ($p = 0,000$), BCL2L1 ($p = 0,001$) e CD36 ($p = 0,004$). Notavelmente entre os tumores *borderline* x adenocarcinoma, foi observada variação apenas da expressão de APEX1 ($p = 0,005$), além de uma eventual tendência de variação da parkina ($p = 0,053$). Estes resultados sugerem uma maior distinção observada entre /os subtipos cistoadenoma x adenocarcinoma e uma possível semelhança entre tumores *borderline* x adenocarcinomas, visto que apenas APEX1 foi diferentemente expressa na comparação entre estes dois subtipos.

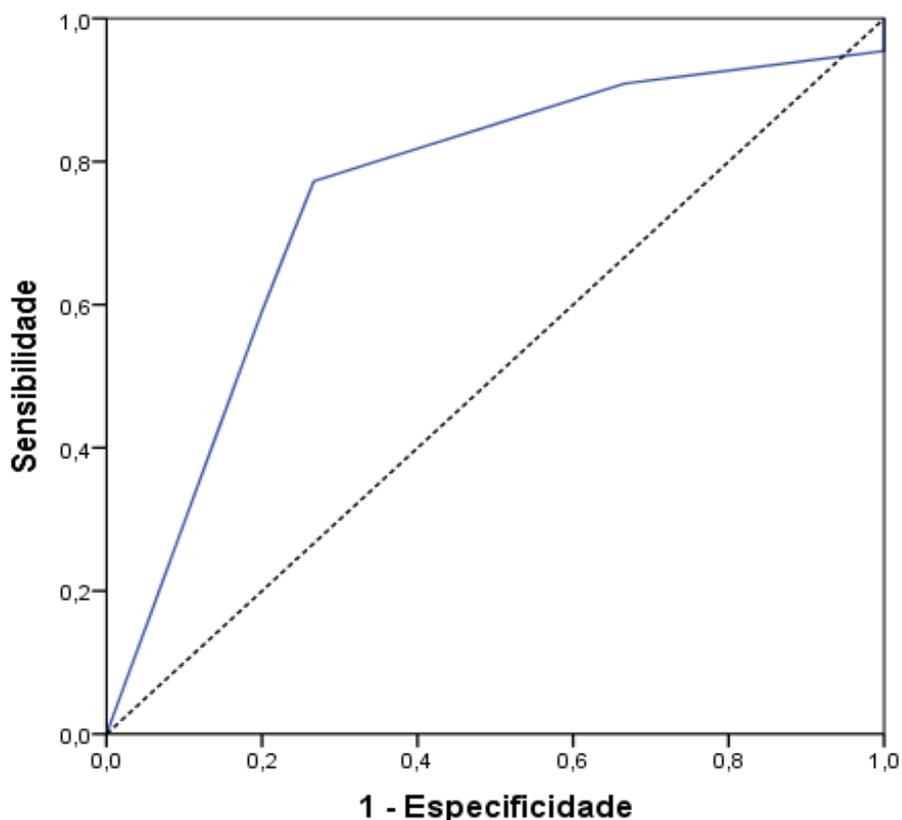
Tabela 9. Comparações entre os perfis de expressão de BCL2L1, CD36, parkina e APEX1 e os subtipos de tumores epiteliais serosos analisados considerados dois a dois.

Comparações	BCL2L1	CD36	Parkina	APEX1
cistoadenoma x <i>borderline</i>	0,123	0,022	0,049	0,040
cistoadenoma x adenocarcinoma	0,001	0,004	0,000	0,000
<i>borderline</i> x adenocarcinoma	0,073	0,629	0,053	0,005

Legenda: comparações envolvendo a expressão de BCL2L1 e CD36: análise de covariância, $p < 0,05$; comparações envolvendo a expressão de parkina e APEX1: teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Uma curva ROC foi ajustada considerando a expressão de APEX1 nos tumores *borderline* e adenocarcinomas, sendo possível encontrar uma correlação para estas duas variáveis ($p = 0,010$) (Figura 11). A área abaixo da curva foi igual a 0,75, valor este que avalia a acurácia de um teste podendo variar entre 0 e 1, onde quanto mais próximo de 1, melhor é seu valor preditivo. Estes resultados indicam que APEX1 é capaz de discriminar bem entre os subtipos *borderline* e adenocarcinoma.

Figura 10: Curva ROC para a expressão de APEX1 em tumores *borderline* e adenocarcinomas.



O melhor ponto de corte foi o Escore de Allred equivalente a 7, com uma sensibilidade de 77,3% e especificidade de 73,3% (Tabela 10). Assim valores de APEX1 ≤ 6 estão associados aos tumores *borderline* e valores de APEX1 ≥ 7 estão associados aos adenocarcinomas. A probabilidade de se tratar de adenocarcinoma uma vez que APEX1 ≥ 7 é de 77,3% e a probabilidade de ser *borderline* dado que APEX1 ≤ 6 é de 73,3%.

Tabela 10. Especificidade e sensibilidade para o ponto de corte 7 com relação à média de expressão de CD36 em tumores epiteliais serosos *borderline* e adenocarcinomas.

APEX1	Classificação tumoral	
	<i>borderline</i>	adenocarcinoma
≤ 6	11 73,3% (especificidade)	5 22,7%
≥ 7	4 26,7%	17 77,3% (sensibilidade)
Total	15	22

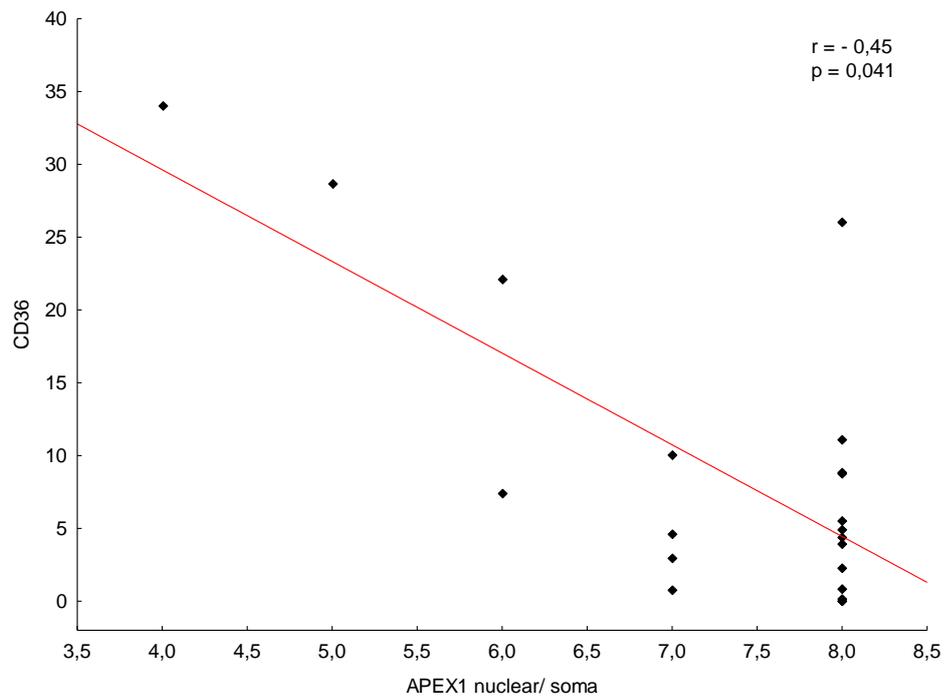
A avaliação da correlação entre a expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 em cada subtipo de tumor estudado revelou uma correlação negativa fraca entre o adenocarcinoma e a expressão de APEX1 e CD36 ($p = 0,041$), (Tabela 11 e Figura 13). Este resultado demonstra que conforme há um aumento da expressão de APEX1 no adenocarcinoma, ocorre a diminuição da expressão de CD36. Ainda, foi observada uma tendência de correlação positiva entre a expressão de CD36 e de parkina em cistoadenoma seroso ($p = 0,052$).

Tabela 11. Correlação da expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 dentro de cada subtipo de tumor epitelial seroso estudado.

Variáveis	cistoadenoma			<i>borderline</i>			adenocarcinoma		
	n	Coeficiente de correlação		n	Coeficiente de correlação		n	Coeficiente de correlação	
			p			p			p
BCL2L1 x APEX1	15	-0,04	0,894	14	0,13	0,669	21	0,2	0,377
BCL2L1 x CD36	18	-0,03	0,913	14	-0,21	0,474	21	-0,29	0,197
BCL2L1 x parkina	18	0,37	0,131	14	0,38	0,177	20	0,31	0,181
APEX1 x CD36	16	0,04	0,876	15	0,35	0,202	21	-0,45	0,041
APEX1 x parkina	16	0,11	0,672	15	0,34	0,217	20	0,23	0,322
CD36 x parkina	18	0,46	0,052	15	0,25	0,376	20	-0,16	0,496

Legenda: n = número de casos; correlação entre marcadores realizada por coeficiente de correlação de Spearman, $p < 0,05$.

Figura 11: Gráfico de correlação de Spearman entre a expressão do marcador CD36 e APEX1.



Legenda: $p < 0,05$; r : coeficiente de correlação.

6. DISCUSSÃO

Os objetivos centrais deste projeto de pesquisa foram avaliar a expressão de parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 nos subtipos histológicos de tumores epiteliais serosos de ovário: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma, com a finalidade de iniciar a investigação de um provável envolvimento da parkina e de alguns de seus alvos de ubiquitinação, além de contribuir para a caracterização imunoistoquímica destas proteínas, buscando a identificação de elementos que possam aprimorar a compreensão e diferenciação dos subtipos tumorais de ovário.

A distinção entre tumores benignos e malignos encontra-se estabelecida na maioria dos casos de tumores de ovário, por exemplo, entre os cistoadenomas e os adenocarcinomas serosos. Eventualmente há dificuldades na compreensão e diferenciação dos tumores *borderline* serosos e de possíveis impactos que possam ser enfrentados ao seu diagnóstico. Ainda, o que atrai a atenção na investigação entre os subtipos *borderline* e adenocarcinomas são os mecanismos em parte desconhecidos que levam à transformação de lesões precursoras em malignas e sua progressão para metástase. O conhecimento destes mecanismos torna-se ainda mais relevante em câncer de ovário, em função de sua letalidade e impactos do tratamento na fertilidade das pacientes jovens.

Os tumores *borderline* são classificados como não invasivos e de baixo potencial de malignidade, entretanto as abordagens para o seu tratamento ainda apresentam controvérsias (Hauptmann *et al.*, 2017; Ukawa *et al.*, 2018). Em mulheres mais jovens e com tumores em estádios iniciais, o planejamento reprodutivo/familiar da paciente é um importante fator a ser levado em consideração. Em casos de detecção avançada, é recomendada a ressecção total de implantes tumorais, incluindo os ovários e anexos ginecológicos (Hauptmann *et al.*, 2017). Não obstante, um dos principais impasses considerados é a idade observada entre as pacientes acometidas por tumores *borderline*, em média dez anos a menos que as pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma seroso de ovário. Em um estudo realizado no Japão com 150 mulheres, 60% das pacientes com tumores *borderline* serosos apresentavam idade inferior a 45 anos (Ukawa *et al.*, 2018). Do mesmo modo, as pacientes aqui estudadas com tumor *borderline* apresentaram média de idade de $41 \pm 11,6$ anos, enquanto as com adenocarcinoma, $58 \pm 10,1$ anos.

A avaliação da expressão imunohistoquímica de proteínas envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer de ovário poderá auxiliar no refinamento do diagnóstico, na avaliação dos riscos e prognóstico tumoral. Nas amostras deste estudo, BCL2L1 ($p = 0,001$), parkina ($p = 0,001$) e APEX1 ($p = 0,000$) exibiram um aumento de expressão de acordo com a evolução cistoadenoma, *borderline* até adenocarcinoma seroso, este último com a maior expressão de todos estes marcadores.

Os resultados se assemelham ao observado em literaturas anteriores (Scott *et al.*, 2016; Gong *et al.*, 2017; Pascual *et al.*, 2017), com exceção de CD36 que, apesar da expressão citoplasmática esperada, apresentou maior expressão nos cistoadenomas. No entanto, a elevada expressão desta proteína tem sido relatada em tumores em estádios avançados, principalmente com intensa proliferação celular e desenvolvimento de metástases, provavelmente devido ao seu papel como receptor de membrana para ácidos graxos (Pascual *et al.*, 2017; Ladanyi *et al.*, 2018).

A expressão de BCL2L1 foi maior em amostras de adenocarcinoma, o que corrobora seu envolvimento em tumores com resistência à apoptose, favoráveis à proliferação de células cancerígenas (Gong *et al.*, 2017; Delbridge e Strasser, 2015).

A parkina foi expressa no citoplasma dos subtipos estudados. Acentuada expressão foi observada principalmente nos adenocarcinomas. Embora a função de parkina não seja ainda totalmente elucidada na tumorigênese ovariana, sabe-se que uma das principais atividades desempenhas por esta proteína está relacionada ao seu papel como E3-Ub ligase. A desregulação da ubiquitinação pode afetar diversas proteínas que fazem parte da rede de regulação de parkina, o que proporciona um ambiente celular com alterações facilitadoras para a progressão tumoral. Alterações na expressão de parkina já foram relatadas em até 60% dos casos de tumores ovarianos primários (Duan *et al.*, 2019; Aguilar-Hernández *et al.*, 2013).

Para APEX1 foi observada expressão nuclear, com um aumento progressivo de expressão entre os subtipos cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma. Esta proteína já foi associada a tumores de ovário de pior prognóstico com elevada proliferação e crescimento celular, sendo uma das principais características do carcinoma seroso de alto grau a apresentação de reparo do DNA defeituoso (Londero *et al.*, 2014) (Wen *et al.*, 2016). Fan e colaboradores (2017), demonstraram em seus estudos que a elevada expressão de APEX1 está relacionada a tumores de pulmão e fígado resistentes à quimioterapia. Os autores também acreditam que o reparo

defeituoso de DNA está associado não apenas ao desenvolvimento e carcinogênese ovariana, mas também à quimioresistência apresentada por estes tumores. Desta forma, a inibição deste reparo ineficiente poderia auxiliar em uma sensibilidade aumentada a medicamentos quimioterápicos à base de platina (Fan *et al.*, 2017).

A análise dois a dois proporcionou o refinamento da comparação sobre a expressão dos marcadores entre os subtipos cistoadenoma e *borderline*, cistoadenoma e adenocarcinoma e *borderline* e adenocarcinoma.

Os cistoadenomas são tumores benignos sem atipias ou mitoses celulares, raramente apresentam disseminação ou malignização (Kossai *et al.*, 2017). Por outro lado, os adenocarcinomas geralmente apresentam quantidade celular elevada, com atipias, mitoses e em alguns casos regiões de necroses, possuindo projeções papilíferas e grande probabilidade de disseminação (Kossai *et al.*, 2017). A diferença entre a expressão dos marcadores, reforça a distinção de comportamento celular entre estes dois subtipos. As proteínas BCL2L1, CD36 e APEX1 foram associadas a tumores malignos de ovário, representando resistência à apoptose celular e sobrevivência de células neoplásicas, assim como desenvolvimento e progressão tumoral, comumente encontrados em casos de adenocarcinoma seroso ovariano (Scott *et al.*, 2016; Londero *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2017; Pascual *et al.*, 2017; Ladanyil *et al.*, 2018).

Entre os subtipos *borderline* e adenocarcinoma foi observada diferença de expressão apenas da proteína APEX1 ($p = 0,005$). Este achado evidencia uma distinção limitada entre os dois subtipos tumorais. Os tumores *borderline* apresentam aparência semelhante aos tumores malignos quando visualizados em exames diagnósticos, sendo a classificação entre estes realizada a partir de biópsia. Histologicamente, os tumores *borderline* apresentam atipia celular leve a moderada, sem invasão do estroma, com disseminação peritoneal menos frequente do que nos carcinomas. As cirurgias para tumores *borderline* também se assemelham aos casos dos tumores invasivos, onde o principal objetivo é a ressecção total do tumor. A semelhança observada entre estes subtipos interfere diretamente nos métodos de tratamento, principalmente, quando considerados os tumores *borderline*, que como descrito anteriormente, afetam uma população consideravelmente mais jovem de pacientes (Hauptmann *et al.*, 2017). A busca por marcadores que auxiliem nesta diferenciação poderá contribuir para uma melhor caracterização entre tumores

borderline e adenocarcinomas ovarianos, auxiliando na descrição e abordagem destes subtipos.

A expressão de APEX1 foi maior em tumores malignos de ovário ($p = 0,000$). Anteriormente, esta proteína demonstrou padrão semelhante de expressão sobre a progressão de células tumorais de ovário. Em análises realizadas por nosso grupo de estudos, foi observada a expressão de APEX1 em diferentes amostras de neoplasias de ovário, incluindo os subtipos mucinosos, serosos, Brenner e endometrióides, onde a elevada expressão de APEX1 foi identificada em tumores de pior prognóstico (dados não publicados). A literatura demonstra que as funções já descritas de APEX1 são associadas a evolução tumoral e a predominante presença de células malignas, pode facilitar a progressão do DNA danificado (Londero *et al.*, 2014; Illuzzi *et al.*, 2017; Scott *et al.*, 2016).

A análise entre os quatro marcadores nos diferentes subtipos tumorais buscou contribuir na elucidação sobre uma possível interferência de parkina na expressão dos seus substratos. A regulação das proteínas realizada através da ubiquitinação de parkina considera diversificados contextos celulares e uma extensa variabilidade de desfechos de acordo com diferentes tumores e seus níveis de progressão (Scott *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2011).

Gong e colaboradores (2017), demonstraram em análises *in vivo* e *in vitro* que o silenciamento de *PRKN* em diversas linhagens tumorais através de siRNA pode levar ao acúmulo de BCL2L1, alterando a estabilidade desta proteína. Apesar disso, os autores ressaltam que os níveis de expressão de BCL2L1 com o silenciamento ou superexpressão de *PRKN* podem variar de acordo com os diferentes tecidos analisados, evidenciando a influência de outros fatores sobre a rede de regulação da proteína (Gong *et al.*, 2017).

A parkina realiza a mono-ubiquitinação de BCL2L1, porém a maneira como é capaz de controlar a expressão desta proteína ainda permanece em discussão (Hollvile *et al.*, 2014; Xian *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2017). É considerável que *PRKN* desempenhe papel sobre a regulação da permeabilidade e apoptose da membrana externa mitocondrial, controlando a estabilidade de BCL2L1 (Gong *et al.*, 2017). Apesar de a mono-ubiquitinação realizar a marcação do substrato sem sinal para degradação, Gong e colaboradores (2017), demonstraram que os níveis de BCL2L1 podem ser reduzidos por parkina e que através da ubiquitinação ela possui interferência sobre a degradação e consequente redução de proteínas da família

BCL-2 (Gong *et al.*, 2017). A expressão observada em nossos resultados indica um aumento simultâneo de BCL2L1 e parkina de acordo com a progressão entre os subtipos, o que talvez possa ser explicado por uma possível desregulação da ubiquitinação, proporcionando o aumento de BCL2L1 e decorrente malignização tumoral.

O papel modulador de BCL2L1 na apoptose encontra-se amplamente retratado na literatura (Gong *et al.* 2017; Yokoyama *et al.*, 2017; Delbridge & Strasser, 2015). A expressão de *PRKN* e silenciamento de *BCL2L1* podem resultar em altos índices de apoptose celular, enquanto, o silenciamento de *PRKN* resulta em um acúmulo de BCL2L1 e conseqüente diminuição de taxas de apoptose (Gong *et al.*, 2017). A desregulação da expressão de parkina pode ser um dos principais pontos para uma superexpressão de membros anti-apoptóticos da família BCL-2, proporcionando a sobrevivência tumoral. Gong e colaboradores (2017), em uma análise com diferentes tipos tumorais descobriram que deleções de *PRKN* são significativamente correlacionadas com a amplificação de *BCL2L1*, evidenciando o papel de supressor tumoral do gene e sua relação imediata com *BCL2L1* (Gong *et al.*, 2017).

APEX1 e CD36 demonstraram correlação inversa entre em amostras de adenocarcinoma seroso ($p = 0,041$). A APEX1 é poli-ubiquitinada por parkina, sendo levada a degradação proteossomal, enquanto CD36 é mono-ubiquitinada, sem sinal degradativo. Tanto a função de reparo de DNA quanto a ativação de fatores de transcrição mediadas por APEX1 são favoráveis a proliferação e sobrevivência celular, o que esclarece sua expressão elevada em tecidos tumorais malignos e resistência a drogas e radiação adquiridas por estas células neoplásicas. Scott e colaboradores (2016), discutiram pela primeira vez os efeitos da ubiquitinação de parkina sobre a APEX1. Os autores observaram efeitos modestos de E3-Ub ligase sobre APEX1 e acreditam que parte disso se deve às localizações distintas de expressão de cada proteína (Scott *et al.*, 2016). APEX1 é preferencialmente nuclear, enquanto a maior atividade de parkina é exercida no citoplasma celular. Contudo, a transfecção de APEX1 para o citoplasma pode favorecer a regulação desta proteína por parkina. Sendo assim, há um grande interesse em investigar a expressão e o papel de APEX1 também na região citoplasmática no desenvolvimento tumoral (Scott *et al.*, 2016).

Em 1999, Kakolyris e colaboradores analisaram a expressão citoplasmática de APEX1 em células tumorais pulmonares, onde a proteína foi associada a um pior

prognóstico tumoral. Di Maso e colaboradores (2015) investigaram, assim como Frossi e colaboradores (2019), a translocação de APEX1 para as mitocôndrias, considerada a principal região de degradação de proteínas induzidas por parkina. Os autores acreditam que essa alteração de localização da proteína pode contribuir para uma melhor atividade de parkina, e conseqüentemente, proporcionar a desaceleração do desenvolvimento tumoral (Di Maso *et al.*, 2015; Kakolyris *et al.*, 1999).

Em glioblastomas, as proporções de parkina e APEX1 foram consideradas baixas, enquanto tecidos cerebrais não neoplásicos demonstraram valores mais elevados. Uma menor expressão de parkina pode ocasionar a alta expressão de APEX1 em tecidos cerebrais. Sendo assim, semelhante ao observado para BCL2L1, a perda de atividade de parkina demonstra capacidade para acarretar a deficiência da regulação e conseqüente degradação de APEX1, levando ao seu acúmulo (Scott *et al.*, 2016; Di Maso *et al.*, 2015).

Em amostras de cistoadenoma, CD36 apresentou uma tendência a correlação positiva com parkina ($p = 0,052$). Uma amostra maior poderia proporcionar um resultado mais preciso. A correlação positiva entre as proteínas pode ser explicada por um possível melhor desempenho da regulação de CD36 por parkina em tumores em estádios iniciais (Kim *et al.*, 2011). A regulação de CD36 por *PRKN*, foi descrita primeiramente em relação ao metabolismo lipídico alterado em doenças neurológicas degenerativas. Kim e colaboradores (2011), realizaram estudos em camundongos com *PRKN* silenciado e observaram sua capacidade de regular respostas metabólicas através de dietas hiperlipídicas. Além disso, mutações heterozigóticas de parkina podem reduzir a captação de ácidos graxos (Kim *et al.*, 2011).

Apesar de parkina promover a mono-ubiquitinação de CD36, estabilizando e gerando o aumento do seu nível na membrana plasmática, os ácidos graxos de cadeia podem induzir CD36 à poli-ubiquitinação, tornando-o alvo de degradação proteossomal. O papel de CD36 na membrana plasmática está relacionado a captação de ácidos graxos, que são armazenados em gotículas lipídicas ou oxidados por mitocôndrias. Os níveis de parkina podem ser regulados por lipídios e desta forma, a ingestão de gordura pode ter um impacto considerável no desenvolvimento tumoral (Zhao *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2011).

É necessário notar que através da técnica empregada neste estudo para análise da expressão das proteínas, não foi possível concluir se parkina ou seus alvos de ubiquitinação APEX1, BCL2L1 e CD36 estão ativos, já que suas atividades não foram

testadas. Apesar do aumento de expressão observado, é fundamental considerar que no ambiente tumoral, algumas proteínas possam apresentar mutações e alterações na sua funcionalidade. Ainda, o número de casos apresentados no estudo pode ter sido um limitador na obtenção das análises anteriores propostas. Da mesma forma, os prontuários médicos das pacientes obtidos nos serviços utilizados demonstraram escassez de informações para análise das variáveis clínicas.

Os achados deste projeto são indicadores sobre a heterogeneidade dos subtipos de tumores epiteliais serosos de ovário, no qual foi possível considerar a identificação de características individuais através de diferentes expressões das proteínas parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 nos subtipos estudados. A proteína APEX1 demonstrou um potencial a ser explorado, principalmente, quanto a sua expressão diferenciada entre os adenocarcinomas e tumores *borderline*. Os resultados obtidos podem indicar APEX1 como um possível marcador na malignização dos subtipos de tumores epiteliais de ovário, onde uma maior expressão de APEX1 pode estar associada a um eventual pior prognóstico. Desta forma, APEX1 poderá auxiliar em uma melhor compreensão e direcionamento de abordagem e tratamento. Contudo, os mecanismos que expliquem a variação da expressão destas proteínas e o papel de APEX1 na tumorigênese ovariana necessitam de estudos complementares para sua completa elucidação.

7. CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados deste estudo, foi possível concluir que:

1. As proteínas parkina ($p = 0,001$), APEX1 ($p = 0,000$) e BCL2L1 ($p = 0,001$) foram diferentemente expressas entre os três subtipos de tumores de ovário epiteliais: cistoadenoma, *borderline* e adenocarcinoma;
2. A proteína APEX1 foi diferentemente expressa de acordo com a classificação dos adenocarcinomas serosos em alto e baixo grau.
3. A associação dois a dois demonstrou que:
 - a. Entre cistoadenomas serosos e tumores *borderline* serosos, parkina ($p = 0,049$), APEX1 ($p = 0,040$) e CD36 ($p = 0,022$) foram significativamente diferentes;
 - b. Entre cistoadenomas serosos e adenocarcinomas serosos, parkina ($p = 0,000$), APEX1 ($p = 0,000$), BCL2L1 ($p = 0,001$) e CD36 ($p = 0,004$) foram significativamente diferentes;
 - c. Entre tumores *borderline* serosos e adenocarcinoma serosos, apenas APEX1 ($p = 0,005$) foi expressa de maneira significativamente diferente;
4. Através da curva ROC foi possível observar que APEX1 discrimina bem entre os subtipos adenocarcinoma seroso e *borderline* seroso. O melhor ponto de corte definido foi 7, com especificidade 73,3% e sensibilidade 77,3%. Desta forma, valores de APEX1 ≤ 6 foram associados aos tumores *borderline* seroso e valores ≥ 7 são associados aos adenocarcinomas serosos;
5. Pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma seroso obtiveram uma correlação inversa entre a expressão de APEX1 e CD36 ($p = 0,041$; $r = -0,45$). Quanto maior a expressão de APEX1 menor foi a expressão de CD36.

8. REFERÊNCIAS

ABED, M.N.; ABDULLAH, M.I.; RICHARDSON, A. Antagonismo f BCL2L1 is necessary for synergy between carboplatin and BH3 mimetics in ovarian cancer cells. **J Ovarian Res.** v.14, n.9. 2016.

ABUMRAD, A; DARRE, J. “Parkin reinvents itself to regulate fatty acid metabolism by tagging CD36.” **The Journal of clinical investigation.** v.121, n.9, p.3389-92. 2011. doi:10.1172/JCI59219

AGUILAR-HERNÁNDEZ, V. et al. Expansion and Diversification of BTL Ring-H2 Ubiquitin Ligases in Angiosperms: Putative Rabring7/BCA2 Orthologs. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1–21, 2013.

AGIRRE, X. et al. “Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leucemia”. **Int J Cancer.** v.118, p.1945–53. 2006. <https://doi.org/10.1002/ijc.21584>.

ALMEIDA, J.R.C. et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.53, n.3, p.305-316. 2007.

APPEL, M. et al. Screening and diagnosis of ovarian cancer. **AMRIGS.** v.53, n.3, p.313-318. 2009.

BAE, H.S. et al. Obesity and epithelial ovarian cancer survival: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Ovarian Research.** n.7, v.1. 2014.

BAST, R.C; HENNESSY, B.; MILLS, G.B. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. **Nature Rev Cancer.** v.9, n.6, p.415-428. 2009.

BEREK, J.S.; BAST, R.C.; Epithelial Ovarian Cancer. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12433/>

CABRAL, B. B. et al. Expressão da Proteína PARQUINA em Câncer de Ovário Epitelial. 2018.

CANNISTRA, S.A. Cancer of the ovary. **N Engl J Med.** v.351, n.25, p.2519-2529. 2004.

CAPRIGLIONE, S. et al. Ovarian cancer recurrence and early detection: may HE4 play a key role in this open challenge? A systematic review of literature. **Medical Oncology**, [s. l.], v. 34, n. 9, 2017.

CARDENAS, C. et al. Adipocyte microenvironment promotes Bclxl expression and confers chemoresistance in ovarian cancer cells. **Apoptosis.** v.22, n.4, p.558-569. 2017.

CESARI, R. et al. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.100, n.10, p.5956-5961. 2003.

CHATTOPADHYAY R., et al. Identification and characterization of mitochondrial a basic (AP)endonuclease in mammalian cells. **Nucleic Acids Res.**34, 2067–2076. 2006

CHIEN, J. et al. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. **Front Oncol.** v.3, n.251. 2013.

CHILDERS, K.K.; MAGGARD-GIBBONS, M.; MACINKO, J.; National distribution of cancer genetic testing in the United States. **JAMA Oncol.** v.4, n.6, p.876-879. 2018.

CHOUCH, F.J. et al. Genome-wide association study in *BRCA1* mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. **PLOS Genet.** v.9, n.3. 2013.

CHYKE, A. et al. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. **Am Fam Physician.** v.93, n.11, p.937-944. 2016.

CORZO, C. et al. Role of Fallopian Tubes in the Development of Ovarian Cancer. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 230–234, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmig.2016.12.007>>

CUELLO, M.A.; KATO, S.; LIBERONA, F. The impact on high-grade serous ovarian cancer of obesity and lipid metabolism-related gene expression patterns: the

underestimated driving force affecting prognosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.22, n.3. 2018.

DA SILVA-CAMARGO, C.C.V. et al. Parkin protein expression and its impact on survival of patients with advanced colorectal cancer. **Cancer Biol Med**. v.15, n.1, p.61-69. 2018.

DELBRIDGE, A.R.; STRASSER, A. The BCL-2 protein Family, BH3-mimetics and cancer therapy. **Cell Death Differ**. v.22, n.7, p.1071-1080. 2015.

DUAN, H. et al. PARK2 Suppresses Proliferation and Tumorigenicity in Non-small Cell Lung Cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, 2019.

FENG, W. et al. Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019.

FRITZ G. et al. Human APE/Ref-1 protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 925–929. 2000. GEYER CE, FORSTER J, LINDQUIST D, CHAN S, ROMIEU CG, PIENKOWSKI T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med**. 355(26):2733-43. 2006.

FROSSI B. et al. Endonuclease and redox activities of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 have distinctive and essential functions in IgA class switch recombination. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 13, p. 5198–5207, 2019

GONG, Y. et al. Pan-Cancer analysis links PARK2 to BCL2L1 dependent control of apoptosis. **Neoplasia**. v.19, n.2, p.75-83. 2017.

HALE, J.S. et al. Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression. **Stem Cells**. v.32, n.7, p.1746-1758. 2014.

HAUPTMANN, S. et al. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. **Virchows Archiv**, [s. l.], v. 470, n. 2, p. 125–142, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-016-2040-8>.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2020-2022: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2020.

ILLUZZI, J. "Tumor-associated APE1 variant exhibits reduced complementation efficiency but does not promote cancer cell phenotypes." **Environmental and molecular mutagenesis**. vol. 58,2 (2017): 84-98. doi:10.1002/em.22074

JIN, J.; XIONG, Y.; CEN, B. Bcl-2 and BCL2L1 mediate resistance to receptor tyrosine kinase-targeted therapy in lung and gastric cancer. **Anticancer Drugs**. v.28, n.10, p.1141-1149. 2017.

JUNG, J.H.; CHOI, J.E.; SONG, J.H.; AHN, S.H. Human CD36 overexpression in renal tubules accelerates the progression of renal diseases in a mouse model of folic acid-induced acute kidney injury. **Kidney Res Clin Pract**. v.37, n.1, p.30-40. 2018.

JUHNKE, M. et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2: ERG fusion. **Molecular Carcinogenesis**. v.56, n.9, p.2135–2145. 2017. doi:10.1002/mc.22670.

KAFARA, P. et al. Lipoic acid decreases MLC-1, BCL2L1 and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death. **J Ovarian Res**. v.8, n.36. 2015.

KLIMCZAK, P.F. et al. Association of a *PARK2* germline variant and epithelial ovarian cancer in a Southern Brazilian population. **Oncology**. v.2, n.91, p.101-105. 2016.

KOSSAI, M. et al. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. **Pathobiology**, [s. l.], v. 85, n. 1–2, p. 41–49, 2018.

LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **Eur J Cancer Prev**. v. 26, n.1, p.55-62. 2017.

LADANYI, A. et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. **Oncogene**. v.37, n.17, p.2285-2301. 2018.

LONDERO, A.P. et al. Expression and prognostic significance of APE1/Ref-1 and NPM1 proteins in high-grade ovarian serous cancer. **Am J Clin Pathol**. v.141, n.3, p.404-414. 2014.

MALLEN, A. et al. Surgical prevention strategies in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, [s. l.], v. 151, n. 1, p. 166–175, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.08.005>>. 2018.

MEINHOLD-HEERLEIN, L.; HAUPTMANN, S. **Arch Gynecol Obstet**. The heterogeneity of ovarian câncer. v.289, n.2, p.237-239. 2014.

MERINO, D.; LOK, S.W.; VISVADER, J.E.; LINDEMAN, G.J. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. **Oncogene**. v.14, n.35, p.1877-1887. 2016.

MUTCH, D.G.; PRAT, J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. **Gynecol Oncol**. v.133, n.3, p.401-404. 2014.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) - PRKN parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase [Homo sapiens (human)] – 2018 - <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5071>>. Acesso em 12 de agosto de 2019.

NASEEM A., et al. Genetic and epigenetic alterations affecting PARK-2 expression in cervical neoplasm among north Indian patients. **Tumor Biol**. v.39, 2017. <https://doi.org/10.1177/1010428317703635>.

NI, H. et al. Inactivation of parkin by promoter methylation correlated with lymph node metastasis and genomic instability in nasopharyngeal carcinoma. **Tumor Biol**. v.39 2017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695025>.

NIPIN, S.P.; et al. Nobiletin Inhibits CD36-dependent tumor angiogenesis, migration, invasion, and sphere formation through the CD36/STAT3/NF-KB signaling axis. **Nutrients**. v.10, n.6.

ODUNSI, K. Immunotherapy in ovarian cancer. **Ann Oncol**, [s. l.], v. 28, n. Supplement 8, p. 1–7, 2017.

PACHECO, F.A.; PASCHOAL, M.E.M.; CARVALHO, M.G.C. Tumor markers in lung cancer: a pathway to biological therapy. **J Pneumol**. v. 28, n.3, p.143-149. 2002.

PANUCCIO, E. et al. Use of PlasmaJet for Peritoneal Carcinomatosis in Ovarian Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 1521–

1524, 2016.

PASCUAL, G. et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Nature**, [s. l.], v. 541, n. 7635, p. 41–45, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature2079>.

POULOGIANNIS, G. et al. Recent progress in understanding the pathology. **Journal of Pathology, The**, [s. l.], n. August, p. 400–409, 2009.

QURESHI, A; PERVEZ, S. Original Article Allred scoring for ER reporting and it ' s impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers Study Population: ER Immunohistochemical Analysis: **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 350–353, 2010.

RAFNAR, T. et al. Mutations in *BRIP1* confer high risk of ovarian cancer. **Nat Genet.** v.43, n.11, p. 1104-1107. 2011.

RASMUSSEN, C. B. et al. Is pelvic inflammatory disease a risk factor for ovarian cancer? **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 104–109, 2017.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico de neoplasias de ovário: papel dos marcadores tumorais. **Rev.Bras.Ginecol.Obstet.** v.27, n.4, p.222-227. 2005.

RISTOW, C.M.; YAMAMOTO, C.T.; FÁVARO, M. Fatores de risco e patogênese de neoplasias malignas epiteliais de ovário: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia.** n.52, v.2, p.185-195. 2006.

ROMERO, I.; BAST, R.C. Human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. **Endocrinology.** v.153, n.4, p.1593-1602. 2012.

SCOTT, T. L. et al. Polyubiquitination of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 by Parkin. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 325–336, 2017.

SEO, M. et al. Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: A framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 9, 2011.

SHIH, L.; KURMAN, R.J.; Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **Am J Pathol.** v.164, n.5, p.1511-1518. 2004.

SINGH, A. et al. Induction of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells by the therapeutic opioid methadone and effective synergy with Bcl-2 inhibition. **Leuk Res.** v.35, n.12, p.1649-1657. 2011.

SONG, H. et al.; Contribution of germline mutations in the *RAD51B*, *RAD51C*, and *RAD51D* genes to ovarian cancer in the population. **J Clin Oncol.** v.10, n.33, p.2901-2907. 2015.

SPRITZER, P.M.; MORSCH, D.M.; WILTGEN, D. Polycystic ovary syndrome associated neoplasms. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.49, n.5, p.805-810. 2005.

UKAWA, S. et al. Association between average daily television viewing time and the incidence of ovarian cancer: findings from the Japan Collaborative Cohort Study. **Cancer Causes and Control**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 213–219, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10552-018-1001-8>>.

VALENTE, V.; MASSABKI, P.S. Marcadores tumorais de câncer de ovário: o que há de novo?. **Rev Bras Clin Med.** v.9, n.5, p.377-381. 2011.

WALSH, T. et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 44, p. 18032–18037, 2011.

WANG, L.; CHEN, R.; ZHANG, Y. MiR-296-3p targets APEX1 to suppress cell migration and invasion of non-small-cell lung cancer. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 2612–2618, 2019.

WEN, W. et al. Prediction of breast cancer risk based on common genetic variants in women of East Asian ancestry. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0786-1>.

YOKOYAMA, T.; KOHN, E.C.; BRILL, E.; LEE, J. Apoptosis is augmented in high-

grade serous ovarian cancer by the combined inhibition of Bcl-2/BCL2L1 and PARP. **Inst J Oncol.** v.50, n.4, p.1064-1074. 2017.

XIAO, X. et al. Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. **PLOS ONE.** v.9, n.2. 2014.

ZHAO, J. et al. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. **Oncol Rep.** v.38, n.4, p.2105-2115. 2017.

ZHENG, G. et al. Familial risks of ovarian cancer by age at diagnosis, proband type and histology. **Plos One.** v.13, n.10. 2018.

ZHOU, X. Y.; SHU, X. M. TRIP13 promotes proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells through Notch signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 522–529, 2019.

WANG, L.C.R.; ZHANG, Y. miR-296-3p targets APEX1 to suppress cell migration and invasion of non-small-cell lung cancer. **Oncology letters**, v.18, n.3, p. 2612–2618. 2019.doi:10.3892/ol.2019.10572.

ANEXOS



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE
DE CULTURA - PUCPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS, HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS COM O CÂNCER DE OVÁRIO

Pesquisador: Vanessa Santos Sotomaior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 64575817.7.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.022.676

Apresentação do Projeto:

O estudo conduzirá um estudo de associação entre genes candidatos à carcinogênese do CO. Além disso, será analisado a expressão imunistoquímica das proteínas com potencial envolvimento no desenvolvimento deste câncer. Para tanto, o projeto ocorrerá em duas fases, sendo:

Fase A: Serão avaliadas peças cirúrgicas dos tumores de ovário, que foram coletados para exames de biópsia em dois hospitais de Curitiba, Paraná: Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Santa Cruz, com intervalo de 2012 até 2016. O levantamento dos casos será feito no banco de dados do laboratório de anatomia-patológica do Hospital Santa Cruz. Será avaliada a expressão de proteínas sugestivas à carcinogênese do CO em lâminas preparadas a partir das amostras de biópsias dos blocos doadores, visando descrever padrões de imunistoquímica de proteínas de interesse em câncer de ovário (CO). Serão incluídas no estudo amostras que apresentarem tecido tumoral com qualidade e quantidade suficientes para análise imunistoquímica e dados clínicos disponíveis. Os critérios de exclusão serão: casos com bloco de parafina não localizado, pacientes que tiverem recebido tratamento de quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante e amostras que não apresentarem qualidade técnica suficiente para análise imunistoquímica. Como controles negativos das amostras das biópsias de CO, serão utilizadas, quando possível, as amostras das

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 2.022.676

biópsias do outro ovário livre de neoplasia da mesma paciente retirado no momento da cirurgia (histerectomia profilática). Serão reunidos os dados clínicos dos prontuários das pacientes e dos controles participantes da pesquisa para correlação com os resultados obtidos, entre eles: idade, etnia, número de lesões, tamanho do tumor, aspecto macroscópico das lesões, estadiamento TNM, classificação anatomopatológica, região tumoral, grau de diferenciação, localização e invasão do tumor, comprometimento de linfonodos, caráter da cirurgia e contagem de plaquetas. Todos os dados são codificados, preservando a identidade e privacidade dos envolvidos.

Fase B: A coleta das amostras de sangue e biópsia das pacientes com CO será realizada em três hospitais de Curitiba, Paraná: Hospital Erasto Gaertner, Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Santa Cruz, com estimativa de 200 casos. As amostras de sangue dos controles serão coletadas nos mesmo hospitais, entre as acompanhantes não consanguíneas, com estimativa de 200 amostras. A etapa experimental para amostras de sangue consistirá em: extração e purificação de DNA, quantificação, diluição e genotipagem. A partir das biópsias obtidas na fase A e B, serão confeccionadas lâminas de microarranjo de tecido (TMA - tissue microarray) para avaliar a expressão de proteínas sugestivas à carcinogênese do CO. Serão reunidos os dados clínicos dos prontuários das pacientes e informações obtidas dos controles participantes da pesquisa para correlação com os resultados obtidos, sendo eles: idade, etnia, número de lesões, tamanho do tumor, aspecto macroscópico das lesões, estadiamento TNM, classificação anatomopatológica, região tumoral, grau de diferenciação, localização e invasão do tumor, comprometimento de linfonodos, caráter da cirurgia e contagem de plaquetas. Todos os dados são codificados, preservando a identidade e privacidade dos envolvidos. Os resultados obtidos em ambas as fases serão correlacionados com os dados clínicos das pacientes participantes do estudo e submetidos à análise estatística.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos citados no "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf" são:

Objetivo Primário:

Estudar a associação entre fatores genéticos e câncer de ovário, para ampliar a compreensão dessa patologia.

Objetivo Secundário:

Investigar a associação entre a expressão das proteínas estudadas e características genéticas e clínicas das pacientes selecionadas com câncer de ovário.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 2.022.676

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram adequadamente apresentados no "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf", estando em consonância com a Res. CNS 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa apresenta correlação entre objetivos e metodologia, estando em acordo com a Res. CNS 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

termos obrigatórios apresentados e de acordo com a resolução 466/12

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências projeto aprovado

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf	12/04/2017 17:24:59		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_instituicao.pdf	12/04/2017 17:21:39	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.docx	12/04/2017 17:20:35	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES.docx	12/04/2017 17:20:24	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Declaracao_ao_comite_HEG.pdf	08/02/2017 15:58:34	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/02/2017 15:42:55	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	07/02/2017 10:40:51	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Qualificacao_dos_pesquisadores.	06/02/2017	Vanessa Santos	Aceito

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

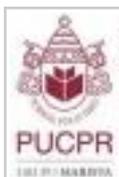
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 2.022.676

Outros	docx	22:28:20	Sotomaior	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_de_Utilizacao_de_Dados.pdf	06/02/2017 22:26:27	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_do_projeto.pdf	06/02/2017 22:24:59	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	06/02/2017 22:24:17	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_especifico_do_material_e_dados_coletados.pdf	06/02/2017 22:21:52	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidade_do_Pesquisador.pdf	06/02/2017 22:15:21	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_amostras.pdf	06/02/2017 22:10:09	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_do_pesquisador.pdf	15/09/2016 15:41:54	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECONTROLESPhamela.docx	20/04/2017 08:31:06	NAIM AKEL FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPACIENTESPhamela.docx	20/04/2017 08:31:21	NAIM AKEL FILHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 20 de Abril de 2017

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS, HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS COM O CÂNCER DE OVÁRIO

Pesquisador: Vanessa Santos Sotomaior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 64575817.7.3002.0098

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.281.168

Apresentação do Projeto:

Introdução:

O câncer de ovário (CO) é a sétima causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo (WCRF, 2016), sendo uma doença multifatorial de alta malignidade, frequentemente assintomática e para a qual não há um método específico de detecção precoce (Cannistra, 2004). Estas características, ou a combinação entre elas, levam a diagnósticos em estádios (Tabela 1) avançados da doença, contribuindo para os altos índices de mortalidade observados (WCRF, 2016). O CO acomete células germinativas, gonadais e mesenquimatosas deste órgão, e pode ser classificado em carcinoma epitelial, estromal e de células germinativas (Ristow et al., 2006). O carcinoma epitelial é o mais frequente, e compreende as seguintes categorias: seroso de alto/baixo grau, mucinoso, endometrióide, tumor de células claras, borderline e indiferenciado (Romero e Bast, 2012). Estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de CO: nuliparidade, obesidade, origem europeia, uso de drogas indutoras de ovulação, altos níveis de estrógenos e de androgênios e fatores genéticos. Estudos apontam risco aumentado de desenvolvimento de CO em mulheres que apresentam mutações nos genes BRCA1 (breast cancer 1), BRCA2 (breast cancer 2) (Lynch et al., 2009), PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Kuhn, 2013) e TP53 (tumor protein

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Continuação do Parecer: 2.281.168

p53) (Bast et al., 2009). Por outro lado, entre os fatores protetores encontram-se: paridade, amamentação, uso de anticoncepcionais orais, menarca tardia, menopausa precoce e procedimentos cirúrgicos, como histerectomia e ligação tubária (Ristow et al., 2006). Dados epidemiológicos sobre o CO nos Estados Unidos apontam para 22.280 casos novos em 2016 e 14.240 mortes registradas no ano de 2015 (WCRF, 2016). No Brasil, estima-se que em 2016, o número de novos casos de CO será de 6.150, com um risco estimado de 6,15 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016). A maior parte dos diagnósticos dessa patologia ocorre nos estádios avançados, pela falta de marcadores específicos que proporcionem uma detecção precoce. Entre as ferramentas diagnósticas disponíveis para detecção do CO, estão a ultrassonografia pélvica, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e marcadores biológicos. Os marcadores tumorais mais frequentemente usados em seu diagnóstico são: CA 125 (antígeno do câncer 125), CA 15.3 (antígeno carboidrato 15.3), CA 72.4 (antígeno carboidrato 72.4), MCA (antígeno mucinóide associado ao carcinoma), B-HCG (gonadotrofina coriônica humana), PLAP (fosfatase alcalina placentária) e a proteína codificada pelo gene KRAS (kirsten ras) (Apell et al., 2009). Todavia, pela existência de vários subtipos de CO, os quais são extremamente heterogêneos em suas características clínicas, moleculares e histopatológicas (Kwong e Shin, 2011), o diagnóstico deste câncer deve ser realizado pela associação entre dois ou mais métodos, pois os resultados podem variar nos diferentes estádios e tipos do tumor. Mesmo o uso de marcadores moleculares ainda é pouco eficaz na detecção precoce da doença (Valente e Massabki, 2011), não permitindo uma utilização categórica, por estarem presentes em outras situações como as benignas, tendo apenas sua especificidade aumentada quando o CO se apresenta em estágio avançado. Estudos sobre a origem e desenvolvimento do CO envolvem a pesquisa de genes e suas respectivas vias de sinalização que controlam o crescimento, a apoptose, a invasão e a metástase celular. As principais vias descritas envolvidas neste câncer são as dos genes: NF- κ B (factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Gilmore et al., 2001), Jak-STAT 3 (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription 3) (Prata et al., 2004; Duan et al., 2007), MAPK (mitogen activated kinase-like protein) (Spandidos et al., 2002), PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha) (Janku et al., 2012) e EGFR (epidermal growth factor receptor). Além das vias dos receptores de estrogênio (Imamov et al., 2004), dos receptores da proteína do gene AMH (anti-Mullerian hormone) (Teixeira et al., 2001) e do ácido lisofosfatídico (Braun e Coffey, 2005; Longuespée et al., 2012). A interleucina 6 parece ser importante na carcinogênese ovariana participando das cascatas de sinalização Jak-STAT, MAPK e PI3K (Asschert et al., 1999). Entre os genes candidatos ao desenvolvimento do CO está o PARK2 (parkin RBR E3

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Continuação do Parecer: 2.281.168

ubiquitin protein ligase), ele codifica uma proteína denominada parkina que possui como função principal a ubiquitinação de proteínas, o controle do ciclo celular, a resposta ao estresse, a homeostase mitocondrial e mais recentemente vem sendo descrito como supressor tumoral [9, 10, 11, 12, 13] Mutações neste gene já foram associadas a Parkinsonismo Juvenil Autossômico Recessivo [14] hanseníase [15], diabetes mellitus tipo 2 [16], Alzheimer [17], esclerose múltipla [18], ADHD (déficit de atenção/desordem de hiperatividade) [19], autismo [20], febre tifoide e febre paratifoide [21, 22]. Além disso alterações no gene PARK2 foram descritos em vários tipos de cânceres, tais como: ovário, mama, rim, pulmão [23] e melanoma, bem como hematológicos tais como leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Burkitt e linfoma de células B não Hodgkin. Em estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa (publicado na revista Oncology – Karger), o gene PARK2 mostrou-se associado ao desenvolvimento do câncer de ovário epitelial. Foram recrutados 25 pacientes no Hospital Erasto Gaertner e 87 controles no Hemobanco, as duas instituições em Curitiba, Paraná. A análise multivariada para a combinação entre os modelos aditivo e dominante indicou associação do marcador rs2803073 do gene PARK2 ($p=0,018$, $OR=0,42$) e câncer de ovário epitelial.

Hipótese:

Há fatores genéticos, histopatológicos e clínicos associadas com o risco para o desenvolvimento do câncer de ovário.

Metodologia:

As pacientes serão recrutadas no ambulatório de oncologia ginecológica de três hospitais de Curitiba, Paraná: Erasto Gaertner, Nossa Senhora das Graças e Santa Cruz, no período de agosto de 2017 a dezembro de 2020, após aprovação deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR. Para evitar qualquer distorção na análise, gerada pelo tempo de sobrevivência das pacientes, apenas serão recrutados casos novos. De cada paciente serão obtidas amostras de sangue periférico e das biópsias realizadas para a confirmação do diagnóstico de CO. Da mesma forma, serão coletadas amostras de sangue periférico de controles, no momento da coleta serão submetidas a um questionário para caracterização desse grupo, com informações como: idade, etnia e histórico de câncer na família. As informações clínicas referentes às pacientes estudadas serão coletadas diretamente nos prontuários eletrônicos, sob a supervisão dos médicos responsáveis. Para realização de um estudo complementar, visando descrever padrões de imunistoquímica das proteínas de interesse em CO, serão selecionadas, por meio de prontuários

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Continuação do Parecer: 2.281.168

eletrônicos, amostras de biópsias de pacientes com CO confirmado por exame anatomopatológico nos hospitais Nossa Senhora das Graças e Santa Cruz, no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2016. Serão incluídas no estudo amostras que apresentarem tecido tumoral com qualidade e quantidade suficientes para análise imunoistoquímica e dados clínicos disponíveis. Como controles negativos das amostras das biópsias de CO serão] utilizadas, quando possível, as amostras de biópsias do outro ovário livre de neoplasia da mesma paciente retirado no momento da cirurgia (histerectomia profilática). As amostras de sangue periférico das pacientes e dos controles serão usadas na extração e purificação de DNA pela técnica de salting out, descrita por John et al. (1991) e modificada por Lahiri e Nurnberger (1991). Esta técnica consiste nas etapas de lise das hemácias, lise dos núcleos dos linfócitos, remoção das proteínas e precipitação, lavagem e diluição do DNA em tampão. Depois da diluição, as amostras serão quantificadas e estocadas a 40C até sua utilização. A genotipagem dos genes candidatos ao CO será realizada utilizando o equipamento de RT-PCR (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System) e tecnologia TaqMan™ (Applied Biosystems). Para tanto, serão selecionados, de acordo com informações do International HapMap Project, os marcadores do tipo tagSNPs que permitam cobertura física total desses genes. Os casos de CO serão revisados em suas lâminas e prontuários dos pacientes, com o objetivo de confirmação do diagnóstico e de coleta de dados clinicopatológicos relevantes para descrição fenotípica de cada paciente. Será coletado material dos blocos de parafina das biópsias de CO e carcinomatose peritoneal chamado de blocos doadores. A partir dos blocos de tecidos doadores, serão realizados cortes histológicos de 4m para a confecção de lâminas com coloração HE (hematoxilina-eosina). Estas lâminas serão sequencialmente analisadas ao microscópio óptico, e uma ou duas áreas morfológicamente representativas do componente tumoral serão selecionadas e delimitadas para serem amostradas dos blocos originais e preparadas em blocos de microarranjo de tecido TMA. Trata-se uma técnica para montagem de blocos de parafina utilizando múltiplas amostras para confecção de lâminas para estudo imunoistoquímico. Essas lâminas serão marcadas com os anticorpos imunoistoquímicos selecionados. A análise imunoistoquímica será realizada no laboratório de patologia experimental da PUCPR, pela técnica da imunoperoxidase após a confecção das lâminas histológicas utilizando a técnica de TMA com equipamento adaptado e de baixo custo. Serão utilizados os anticorpos relacionados às vias de carcinogênese do CO.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar a associação entre fatores genéticos e câncer de ovário, para ampliar a compreensão dessa patologia.

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Continuação do Parecer: 2.281.168

Objetivo Secundário:

Investigar a associação entre a expressão das proteínas estudadas e características genéticas e clínicas das pacientes selecionadas com câncer de ovário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco para o sujeito da pesquisa será um eventual constrangimento ou desconforto gerado pela coleta da amostra (sangue periférico). Não terá nenhum risco adicional aos procedimentos normais que serão realizados para a coleta de biópsia, pois será coletada a amostra no momento da cirurgia de tratamento indicada pelo médico para retirada do tumor.

Benefícios:

As informações obtidas a partir desta pesquisa podem não beneficiar o voluntário diretamente, mas será utilizada para desenvolver um aprendizado geral. A longo prazo os resultados da pesquisa podem levar ao desenvolvimento de, por exemplo, novos métodos para um diagnóstico clínico mais rápido e mais eficiente a um menor custo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para este projeto nada consta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos e considerações apresentado satisfatoriamente.

Recomendações:

Sem recomendações, projeto aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo conforme itens acima analisados, sem lista de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: "ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS, HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS COM O CÂNCER DE OVÁRIO.", cujo número de protocolo é P.P. nº 2594 e tem como pesquisadora responsável V. Sa. Foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e foi Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Dr. Ovande do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Continuação do Parecer: 2.281.168

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf	12/04/2017 17:24:59		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_instituicao.pdf	12/04/2017 17:21:39	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.docx	12/04/2017 17:20:35	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES.docx	12/04/2017 17:20:24	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf	08/02/2017 16:09:56		Aceito
Outros	Declaracao_ao_comite_HEG.pdf	08/02/2017 15:58:34	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/02/2017 15:42:55	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	07/02/2017 10:40:51	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Qualificacao_dos_pesquisadores.docx	06/02/2017 22:28:20	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_de_Utilizacao_de_Dados.pdf	06/02/2017 22:26:27	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_do_projeto.pdf	06/02/2017 22:24:59	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	06/02/2017 22:24:17	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_especifico_do_material_e_dados_coletados.pdf	06/02/2017 22:21:52	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidade_do_Pesquisador.pdf	06/02/2017 22:15:21	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.docx	06/02/2017 22:13:25	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_amstras.pdf	06/02/2017 22:10:09	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_CONTROLES.docx	15/09/2016 15:44:41	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

Continuação do Parecer: 2.281.168

Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES.docx	15/09/2016 15:44:41	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_do_pesquisador.pdf	15/09/2016 15:41:54	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 18 de Setembro de 2017

Assinado por:
Jordan Zanetti Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Dr. Ovande do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS, HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS COM O CÂNCER DE OVÁRIO

Pesquisador: Vanessa Santos Sotomaior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 64575817.7.3001.0096

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.131.666

Apresentação do Projeto:

O estudo avaliará a associação entre genes candidatos à carcinogênese do CO, tais como o gene PARK2. Serão recrutados uma média de 200 pacientes e 200 controles em três hospitais de Curitiba, Paraná: Hospital Erasto Gaertner, Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Santa Cruz, para a pesquisa de variantes de suscetibilidade para o CO. Além disso, será analisado a expressão imunoistoquímica das proteínas com potencial envolvimento no desenvolvimento deste câncer.

Consistirá em duas fases, uma fase retrospectiva (A) e outra prospectiva (B).

Fase A: Serão avaliadas peças cirúrgicas dos tumores de ovário, que foram coletados para exames de biópsia em dois hospitais de Curitiba, Paraná: Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Santa Cruz, com intervalo de 2012 até 2016. O levantamento dos casos será feito no banco de dados do laboratório de anatomia-patológica do Hospital Santa Cruz. Será avaliada a expressão de proteínas sugestivas à carcinogênese do CO

em lâminas preparadas a partir das amostras de biópsias dos blocos doadores, visando descrever padrões de imunoistoquímica de proteínas de interesse em câncer de ovário (CO). Serão incluídas no estudo amostras que apresentem tecido tumoral com qualidade e quantidade suficientes para

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.131.666

análise imunoistoquímica e dados clínicos disponíveis. Os critérios de exclusão serão: casos com bloco de parafina não localizado, pacientes que tiverem recebido tratamento de quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante e amostras que não apresentarem qualidade técnica suficiente para análise imunoistoquímica. Como controles negativos das amostras das biópsias de CO, serão utilizadas, quando possível, as amostras das biópsias

do outro ovário livre de neoplasia da mesma paciente retirado no momento da cirurgia (histerectomia profilática). Serão reunidos os dados clínicos dos prontuários das pacientes e dos controles participantes da pesquisa para correlação com os resultados obtidos, entre eles: idade, etnia, número de lesões, tamanho do tumor, aspecto macroscópico das lesões, estadiamento TNM, classificação anatomopatológica, região tumoral, grau de diferenciação, localização e invasão do tumor, comprometimento de linfonodos, caráter da cirurgia e contagem de plaquetas. Todos os dados são codificados, preservando a identidade e privacidade dos envolvidos. Fase B: A coleta das amostras de sangue e biópsias das pacientes com CO será realizada em três hospitais de Curitiba, Paraná: Hospital Erasto Gaertner, Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Santa Cruz, com estimativa de 200 casos. As amostras de sangue dos controles serão coletadas nos mesmo hospitais, entre as acompanhantes não consanguíneas, com estimativa de 200 amostras. A etapa experimental para amostras

de sangue consistirá em: extração e purificação de DNA, quantificação, diluição e genotipagem. A partir das biópsias obtidas na fase A e B, serão confeccionadas lâminas de microarranjo de tecido (TMA - tissue microarray) para avaliar a expressão de proteínas sugestivas à carcinogênese do CO. Serão reunidos os dados clínicos dos prontuários das pacientes e informações obtidas dos controles participantes da pesquisa para correlação com os resultados obtidos, sendo eles: idade, etnia, número de lesões, tamanho do tumor, aspecto macroscópico das lesões, estadiamento TNM, classificação anatomopatológica, região tumoral, grau de diferenciação, localização e invasão do tumor, comprometimento de linfonodos, caráter da cirurgia e contagem de plaquetas. Todos os dados são codificados, preservando a identidade e privacidade dos envolvidos. Os resultados obtidos em ambas as fases serão correlacionados com os dados clínicos das pacientes participantes do estudo e submetidos à análise estatística.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar a associação entre fatores genéticos e câncer de ovário, para ampliar a compreensão dessa patologia.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.131.666

Investigar a associação entre a expressão das proteínas estudadas e características genéticas e clínicas das pacientes selecionadas com câncer de ovário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: o risco para o sujeito da pesquisa será um eventual constrangimento ou desconforto gerado pela coleta da amostra (sangue periférico). Não terá nenhum risco adicional aos procedimentos normais que serão realizados para a coleta de biópsia, pois será coletada a amostra no momento da cirurgia de tratamento indicada pelo médico para retirada do tumor.

Benefícios: as informações obtidas a partir desta pesquisa podem não beneficiar o voluntário diretamente, mas será utilizada para desenvolver um aprendizado

geral. A longo prazo os resultados da pesquisa podem levar ao desenvolvimento de, por exemplo, novos métodos para um diagnóstico clínico mais rápido e mais eficiente a um menor custo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa apresenta coerência entre objetivos e metodologia. Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP de acordo com a resolução 466/12

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios apresentados e de acordo com a resolução 466/12

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ausência de Pendências ou Inadequações. Projeto aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



UFPR - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.131.666

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf	12/04/2017 17:24:59		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_instituicao.pdf	12/04/2017 17:21:39	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.docx	12/04/2017 17:20:35	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES.docx	12/04/2017 17:20:24	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776663.pdf	08/02/2017 16:09:56		Aceito
Outros	Declaracao_ao_comite_HEG.pdf	08/02/2017 15:58:34	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/02/2017 15:42:55	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	07/02/2017 10:40:51	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Qualificacao_dos_pesquisadores.docx	06/02/2017 22:28:20	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_de_Utilizacao_de_Dados.pdf	06/02/2017 22:26:27	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_do_projeto.pdf	06/02/2017 22:24:59	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	06/02/2017 22:24:17	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_especifico_do_material_e_dados_coletados.pdf	06/02/2017 22:21:52	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidade_do_Pesquisador.pdf	06/02/2017 22:15:21	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.docx	06/02/2017 22:13:25	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_amstras.pdf	06/02/2017 22:10:09	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



UFPR - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.131.666

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES.docx	15/09/2016 15:44:41	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_do_pesquisador.pdf	15/09/2016 15:41:54	Vanessa Santos Sotomaior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 22 de Junho de 2017

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br