



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Warne Pedro de Andrade

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *TRAP1*, *HSPB1*,
HSPD1, *HSPA1L* e *HSPA1A* EM AMOSTRAS DE CÂNCER
EPITELIAL DE OVÁRIO: IMPLICAÇÕES NO
PROGNÓSTICO E NA RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA
BASEADA EM PLATINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Coorientadora: Letícia da Conceição Braga

Botucatu

2018

Warne Pedro de Andrade

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *TRAP1*,
HSPB1, *HSPD1*, *HSPA1L* e *HSPA1A* EM AMOSTRAS
DE CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO: IMPLICAÇÕES
NO PROGNÓSTICO E NA RESISTÊNCIA A
QUIMIOTERAPIA BASEADA EM PLATINA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de mestre em Ginecologia,
Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Coorientadora: Letícia da Conceição Braga

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Andrade, Warne Pedro.

Análise da expressão dos genes *TRAP1*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1L* e *HSPA1A* em amostras de câncer epitelial de ovário : implicações no prognóstico e na resistência a quimioterapia baseada em platina / Warne Pedro Andrade. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho
Coorientador: Letícia da Conceição Braga
Capes: 40101150

1. Neoplasias ovarianas. 2. Câncer - Prognóstico. 3. Proteínas de choque térmico. 4. Agentes antineoplásicos. 5. Quimioterapia. 6. Drogas - Resistência em células cancerosas.

Palavras-chave: câncer de ovário; prognóstico; proteínas do choque térmico; resistência a antineoplásico.



Dedicatória

À minha esposa **Tatiana Andrade**, meus filhos **João Pedro** e **Amanda** pela compreensão das horas em que me fiz ausente e pelas palavras que me deram incentivo e perseverança para a conclusão dessa jornada. Agradeço por cada minuto ao lado de vocês. Do fundo do meu coração, obrigado por existirem na minha vida.



Agradecimentos Especiais

A minha mãe **Maria José de Andrade** pelo início de toda a caminhada, obrigado pelo dom da vida e por tudo que já fez em minha vida.

Ao amigo professor **Agnaldo**, obrigado pela amizade, parceria e acima de tudo competência.

Ao amigo desta jornada **Gabriel Bernades Gil pela** amizade, parceria no dia a dia. Juntos somos mais forte!!!



Agradecimientos

Agradeço à Dra. **Luciana Maria Silva** e Dra. **Letícia da Conceição Braga** e à toda equipe da FUNED, pelo apoio logístico no processamento do material coletado durante as fases do estudo, pela cortesia e disponibilidade. Da **Luciana** e **Letícia** vocês são exemplos de dedicação a ciência. Obrigado pela oportunidade de aprender tanto com vocês. Espero fortalecer nossa parceria e amizade e daqui para frente, juntos, realizar novas descobertas em relação a biologia celular e ao câncer

Ao Dr. **Paulo Henrique Costa Diniz**, pelo apoio e pela cobertura no hospital Vera Cruz nos dias de aula na UNESP

À **Aline Santiago Evangelista**, obrigado pelo companheirismo.

Aos professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UNESP, principalmente a Dra. **Débora Damasceno** por ser uma inspiração em relação a pesquisa científica, ética e competência.

Aos professores Dra. **Angélica Nogueira Rodrigues** e o Dr. **Eduardo Batista Cândido**, por fazem a diferença na Oncoginecologia de Minas.

Aos colegas de curso, pela companhia e amizade.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, em especial à **Solange Sako Cagliari** por toda a dedicação, principalmente com os alunos de longe.

À equipe do Hospital Vera Cruz, pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa. Por ser o hospital que me acolheu e me deu a oportunidade de coordenar o serviço de oncologia.

Às pacientes e familiares, a quem devo a possibilidade desse estudo, e que de forma generosa em um momento tão difícil de dor, doaram partes das amostras tumorais para que fizessem parte de um banco de tumor, sendo usadas neste estudo e em pesquisas futuras, contribuindo com a ciência e com pacientes.



Epígrafe

“_ Morre lentamente quem passa os dias queixando da sua má sorte ou da chuva incessante.

_ Morre lentamente quem abandona um projeto antes de ter iniciado, quem não pergunta sobre um assunto que desconhece ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe.

_ Evitemos a morte em doses suaves, recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior do que o simples fato de respirar.

_ Somente a perseverança fará com que conquistemos um estágio esplêndido de felicidade”

Pablo Neruda



Resumo

Andrade, W.P, Análise da expressão dos genes TRAP1, HSPB1, HSPD1, HSPA1L e HSPA1A em amostras de Câncer epitelial de ovário: Implicações no prognóstico e na resistência a quimioterapia baseada em platina. 2018. 62 f, dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018

Introdução: As proteínas de choque térmico (“Heat Shock Proteins”) são produzidas em resposta ao estresse patofisiológico nas células animais e não só fazem parte de várias etapas da carcinogênese, atuando principalmente como agentes antiapoptóticos, como também estão implicadas em mecanismos de resistência à quimioterapia em vários tipos de tumores. **Objetivo:** O presente estudo visa comparar a expressão dos genes *TRAP1*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1L* e *HSPA1A* nas amostras de CEO (no tumor primário ou na metástase) com a expressão dos mesmos em amostras de tumores ovarianos benignos e tecido ovariano normal e correlacionar a expressão gênica com o prognóstico das pacientes e com a resistência ao tratamento com platina. **Métodos:** Foram avaliadas amostras de 51 pacientes operadas no Hospital Vera Cruz, entre os anos de 2008 a 2011, divididas em quatro grupos: CEO primário (n = 14), CEO metastático (n = 11), cistoadenoma seroso ovariano (n = 07) e ovário normal (n = 19). Utilizou-se a técnica de qRT-PCR para determinar o perfil de expressão dos genes. **Resultados:** As pacientes incluídas neste estudo apresentavam idade média de 56,75 anos. Não houve diferença significativa (valor- $P > 0,050$) na comparação entre a expressão dos genes e os grupos estudados. Os genes *HSPA1A*, *HSPA1L* e *TRAP1* foram subexpressos e se diferiram significativamente dos genes em indivíduos com ovário normal. A expressão dos genes analisados não correlacionou-se com as variáveis quantitativas, como idade, menarca, e tempo após menopausa bem como em relação as dosagens séricas do CA125, presença de ascite e citorredução. Em relação ao estadiamento, observou-se que mulheres com CEO no estadio I e II apresentaram a expressão do gene *TRAP1* significativamente maior que as pacientes no estadio III e IV ($p=0,040$). Ao analisar a expressão dos genes em relação a sobrevida global observou-se que houve influência significativa do nível de expressão dos genes *HSPA1A* sobre o risco de morte das mulheres afetadas por CEO. **Conclusão:** Apesar das limitações em relação ao tamanho da amostra, os resultados obtidos sinalizam para um melhor entendimento da relação entre a expressão destes genes e o câncer de ovário, evidenciando algumas implicações no prognóstico.

Palavras-chave: câncer de ovário, prognóstico, resistência à antineoplásicos, proteínas do choque térmico.



Abstract

Expression of *TRAP1*, *HSPB1*, *HSD1*, *HSPA1L* e *HSPA1A*) genes in ovarian epithelial cancer samples: implication for prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy

Heat Shock Proteins are produced in response to pathophysiological stress and take part in several stages of carcinogenesis, acting primarily as anti-apoptotic agents. They are also implicated in resistance to chemotherapy in several types of tumors. Herein we correlated the expression of genes encoding these proteins and the clinical and pathological aspects of patients with ovarian cancer (OC). METHODS: 51 patients included in the study were divided into four groups: those with primary EOC (n = 14), metastatic EOC (n = 11), ovarian serous cystadenoma (n = 7), with no evidence of ovarian malignancy or control (n = 11). The 57 tumor samples obtained were submitted to RNA extraction and reverse transcription. qRT-PCR was performed to compare the expression of *TRAP1*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1A* and *HSPA1L* in primary and metastatic EOC groups. *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* genes did not differ among the groups (p-value > 0.050). *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* were underexpressed in the primary and metastatic EOC groups with *HSPA1L* showing the lowest expression when compared with normal ovary tissue. *TRAP1* expression was higher in tumors at stage I/II than at stages III/IV. Grade II subjects showed higher *HSPB1* expression. There was no correlation between HSPs expression and age, menarche, parity, period after menopause initiation and CA-125. *HSPA1A* gene was negatively correlated with the risk of dying of OC. There were no differences between HSP expression gene evaluated and overall and disease-free survival. In conclusion, we suggest that downregulation of *HSPA1A*, *HSPA1L* e *TRAP1* could help to clinical evaluation of prognostic in women with EOC.

Keywords: Ovarian cancer, prognosis, resistance to chemotherapy, heat shock proteins, *TRAP1*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPD1*, *HSPB1*

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS	– Acquired Immunodeficiency Syndrome
cDNA	– Complementary DNA
CEO	– Câncer Epitelial de Ovariano
CEP	– Comitês de Ética e Pesquisa em seres humanos
CO	– Câncer de ovário
ELISA	– Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIGO	– Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GOG	– Gynecology Oncology GroupHS
HSP	– Heat Shock Protein
HSP27	- Heat Shock Protein 27
HSP60	– Heat Shock Protein 60
MDR1	– Multiple Drug Resistance
PCR	– Polymerase Chain Reaction
PS	– Performance Status
qRT-PCR	– Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real
RNA	– Ribonucleic Acid
SG	– Sobrevida Global
SLP	– Sobrevida Livre de Doença
TP53	–Gene que codifica a proteína P53 (gene de supressão tumoral)
TRAP1	– Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1
UNESP	– Universidade Estadual Paulista



Índice

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**LISTA DE FIGURAS**

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Câncer Epitelial de Ovário.....	23
1.2 Proteínas de choque térmico e a carcinogênese.....	24
1.3 Proteínas de choque térmico e câncer de ovário: relação com prognóstico e resistência ao tratamento.....	27
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 População em estudo	34
4.2 Processamento das amostras teciduais	36
4.2.1 Extração de RNA	37
4.2.2 Quantificação de RNA.....	38
4.2.3 Avaliação da integridade do RNA	38
4.2.4 Tratamento do RNA com DNase.....	39
4.2.5 Síntese do DNA complementar (cDNA)	39
4.2.6 Obtenção da amostra calibrada para os ensaios de expressão gênica.....	39
4.2.6 Avaliação da Expressão Gênica.....	40
4.3 Análise dos dados.....	41
4.4 Quantificação e análise da quantidade dos ácidos nucléicos obtidos das amostras de tecidos ovarianos	43
4.5 Ensaios de PCR quantitativa em tempo real para avaliação da expressão gênica.....	44
4.6 Análise in silico da rede de interação dos genes.....	47

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
6. ARTIGO – The downregulation xpression of <i>TRAP1</i>, <i>HSP27 (HSPB1)</i>, <i>HSP70 (HSPA1L)</i>, <i>HSP60 (HSPD1)</i> genes in ovarian ephitelial cancer samples: implication for prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy.....	57
ABSTRACT.....	59
INTRODUCCION	60
METHODS	61
RESULTS	64
DISCUSSION	65
FIGURE AND TABLES.....	69
REFERENCES	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
8. ANEXOS.....	85

1. Introdução

1.1 – Câncer Epitelial de Ovário

O câncer epitelial de ovário (CEO) é o sexto tumor mais frequente e a quinta causa de morte por câncer, em mulheres, nos Estados Unidos.^{1,2} A média de idade ao diagnóstico é 63 anos e 70% das pacientes são diagnosticadas já em estadió avançado.³ Os principais subtipos de adenocarcinoma de ovário são o papilífero, o endometrióide, o mucinoso e o de células claras. Embora estudados em conjunto e tratados de maneira semelhante, os subtipos de câncer de ovário (CO) são doenças distintas do ponto de vista molecular, epidemiológico e clínico.^{3,4,5} Recentes estudos tem demonstrado que o câncer de ovário epitelial não é uma doença isolada, mas é composto por um grupo diversificado de tumores que podem ser classificados com base nas características morfológicas e moleculares distintas. Um grupo de tumores, designado tipo I, é composto por carcinomas de baixo grau, endometrióide de baixo grau, de células claras, mucinoso e de transição (Brenner).⁴⁴ Estes tumores geralmente se comportam de forma indolente, são confinados ao ovário na apresentação e, como grupo, são relativamente estáveis geneticamente, não apresentam mutação no TP53, mas cada tipo histológico exibem um perfil genético molecular distinto. Além disso, os carcinomas exibem uma linhagem compartilhada com a neoplasia cística benigna.⁴⁴

Em contraste, outro grupo de tumores, denominado tipo II, é altamente agressivo, evolui rapidamente e quase sempre se apresenta em estágio avançado. Os tumores de tipo II incluem carcinoma seroso de alto grau convencional, carcinoma indiferenciado e tumores mesodérmicos mistos malignos (carcinosarcoma). Eles exibem mutações de TP53 em mais de 80 dos casos e raramente possuem as mutações encontradas no tipo I.⁴ Os tumores de células claras são aqueles com maior resistência à quimioterapia, muito embora os tumores mucinosos também apresentem menor taxa de resposta a regimes contendo platinas, em comparação com tumores papilíferos.^{3,6}

Os fatores prognósticos definidos pela correlação com a sobrevida, em geral refletem o estadiamento da doença ao diagnóstico, o tipo e o grau histológico e a performance *status* (PS) da paciente.⁸ Em relação ao estadiamento, a sobrevida em 5 anos é de cerca de 95% para os casos de tumores localizados no ovário, 70% para os casos com implantação regional e, de aproximadamente 30%, para os tumores disseminados. No

entanto, no momento do diagnóstico, cerca de 20% dos casos apresentam-se localizados e aproximadamente 70% com disseminação à distância.^{1,7} Além destes fatores pré-tratamento, outros que podem ter impacto prognóstico incluem o tipo de tratamento recebido (qualidade da citorredução, agentes utilizados na quimioterapia) e a taxa de resposta ao tratamento, além da toxicidade induzida por este.^{8,9,10}

No que diz respeito ao impacto do tratamento das pacientes com CO, há diferença de sobrevida quando se compara pacientes tratadas por ginecologistas com formação em oncologia e aquelas tratadas por cirurgiões gerais. Assim, a ressecção cirúrgica máxima representa a principal etapa no tratamento do CO, sendo importante, em termos prognósticos, mesmo em pacientes com doença comprometendo o peritônio.^{11,12}

Como descrito acima, a maior parte das pacientes com CEO são diagnosticadas com doença localmente avançada ou metastática (estadiamento III e IV, segundo a classificação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia – FIGO). Assim, mesmo que a cirurgia citoredutora seja um componente fundamental para o tratamento inicial, a maioria das pacientes não pode ser curada com esta modalidade isoladamente, em decorrência de implantes peritoneais residuais micro ou macroscópicos ou metástases à distância. Sendo o CO extremamente sensível à quimioterapia, numerosos agentes antitumorais são utilizados de forma adjuvante e proporcionam respostas objetivas. Desta forma, a quimioterapia resulta em respostas clínicas completas na maioria das pacientes com doença localmente avançada (aproximadamente 75% dos casos).

Os derivados de platina representam atualmente o eixo da quimioterapia do CO. Os estudos iniciais empregaram cisplatina em combinação com ciclofosfamida e esta combinação se tornou o padrão para estudos subsequentes, até que um estudo do GOG (Gynecology Oncology Group) mostrou que a combinação de cisplatina e paclitaxel era superior, tanto em sobrevida livre de progressão (SLP) quanto em sobrevida global (SG).^{13,14} Atualmente, a combinação de carboplatina e paclitaxel é considerada a combinação padrão, após os resultados de dois estudos de não-inferioridade, que demonstraram que a carboplatina tem um perfil de toxicidade mais favorável que a cisplatina com uma eficácia equivalente à esta última.^{15,16,17} De fato, a SLP varia de 16 a 21 meses e a SG de 24 a 60 meses, dependendo do volume de doença ao início da quimioterapia. Em consequência das mudanças nos esquemas de quimioterapia, acima

citadas, a taxa de sobrevida em 5 anos aumentou de 30 para 50% nas últimas 5 décadas.^{13,14,15,16}

No entanto, a despeito do número expressivo de pacientes que respondem ao tratamento inicial, a maioria delas sofrerá uma recaída dentro de 2 anos com resistência fatal à quimioterapia. A sobrevida média após a recidiva é de aproximadamente 2 anos.^{1,13,14} Assim, um problema considerável no tratamento do CO é avaliação prognóstica das pacientes e condução das pacientes que recaem após quimioterapia baseada em platina. Tumores que responderam a um esquema baseado em platina, podem voltar a fazê-lo em um segundo ou terceiro tratamentos, reutilizando a platina.¹⁷ A probabilidade de resposta é intimamente relacionada ao intervalo livre de tratamento (tempo decorrido entre a realização da quimioterapia e a documentação da progressão da doença). Desta forma, as pacientes são classificadas em platino sensíveis (intervalo > 6 meses) ou platino resistentes (intervalo < 6 meses).⁵⁰

Pelo exposto acima, é de suma importância o estudo e caracterização de marcadores moleculares prognósticos e/ou capazes de predizer, ou seja, antecipar a identificação de pacientes resistentes a compostos platínicos.

1.2 Proteínas de choque térmico e a carcinogênese

As proteínas de choque térmico são proteínas conservadas ao longo da evolução, cuja expressão celular é induzida em variadas situações de estresse para a célula. Estas proteínas são classificadas de acordo com seu peso molecular e tem efeitos altamente citoprotetores, comportando-se como chaperonas moleculares para outras proteínas. Todas as ações estão voltadas, em última análise, para o restabelecimento da homeostase após estresse.^{18,19}

Algumas destas proteínas são expressas em situação de normalidade e são constitutivamente abundantes em células normais. Outras se tornam hiperexpressas mediante estresse. Uma vez ocorrido o estresse celular, estas proteínas funcionam como chaperonas de outras proteínas e modulam diretamente as vias de sinalização de apoptose.

As proteínas de choque térmico agem em múltiplos pontos da cascata de apoptose para garantir que o dano induzido pelo estresse não “dispare”, de forma inapropriada, a cascata celular de apoptose. As proteínas de choque térmico são classificadas de acordo com seu peso molecular: HSP90, HSP10, HSP60, dentre outras.^{18,19,20}

O envolvimento das proteínas de choque térmico no desenvolvimento e progressão do câncer é um assunto extremamente estudado e debatido. É conhecido o papel destas proteínas na carcinogênese, em virtude de suas funções anti-apoptóticas e muitos estudos já demonstraram a hiperexpressão destas proteínas em tumores malignos de vários sítios.²¹ Em contraste, com as células normais, que não sofreram qualquer transformação, a expressão das proteínas de choque térmico estão anormalmente altas em células ou tecidos de vários tipos de tumores malignos. Os dados atuais mostram que as proteínas de choque térmico têm um papel fundamental como facilitador da transformação maligna, progressão do tumor e sobrevida do mesmo.²² A contribuição das proteínas de choque térmico para a tumorigênese pode ser atribuída às suas atividades pleiotrópicas, como chaperonas moleculares que proporcionam à célula cancerosa uma oportunidade para alterar atividades de outras proteínas, em particular, as componentes do ciclo celular (cinases e outras proteínas que influenciam crescimento celular tumoral) e apoptose.^{18,19,39}

Em contraste, as proteínas de choque térmico também têm localização extracelular, algumas ligadas à membrana plasmática com função imunogênica, apresentando antígenos para as células apresentadoras de antígenos, aumentando o desenvolvimento de imunidade anti-tumoral.¹⁸ Devido à hiperexpressão e funções nas células tumorais, estas proteínas vêm sendo extensamente estudadas como alvo terapêutico. Muitos autores também estudaram o uso de proteínas de choque térmico para o diagnóstico precoce, como marcadores preditivos de resposta e no seguimento de vários tumores malignos.^{18,21}

1.3 Proteínas de choque térmico e câncer de ovário: relação com prognóstico e resistência ao tratamento

Com relação ao câncer epitelial de ovário, já foi constatado que há hiperexpressão tecidual de algumas proteínas de choque térmico e uma implicação desta expressão no prognóstico das pacientes, bem como uma relação com resistência à platina.^{41,42} Diante de dados levantados por estudos até o momento, as proteínas de choque térmico que demonstram exercer maior influência no câncer de ovário são HSPB1 (HSP27),²⁷ HSD1 (HSP60) e a TRAP1 (HSP90)^{21,32}. A HSPB1 está localizada principalmente no citosol. A expressão desta proteína no CO já foi estudada, no entanto os dados são conflitantes. Elstrand e colaboradores (1996) mostraram que a associação entre expressão de HSPB1 e tumores de alto grau, realizada por meio de imunistoquímica, a partir de células malignas em líquido ascítico, tumores primários e metástases.²³ Langdom e colaboradores (1995) encontraram resultados semelhantes, utilizando a técnica ELISA, em tumores primários e linhagens celulares.²⁴ A resposta imunológica à HSPB1 também está aumentada nas mulheres com CO e outros tumores ginecológicos e alguns estudos sugerem a utilização de concentrações de anticorpos anti-HSPB1 para diagnóstico precoce de recaída ou progressão da doença.^{25,26}

Apesar de alguns autores mostrarem uma associação da HSPB1 com estadiamento precoce da doença e maior sobrevida dos pacientes, a maior parte dos estudos sugere uma associação entre hiperexpressão de HSPB1 e um pior prognóstico. Um destes estudos, realizado por Geisler e colaboradores (2004) e que avaliou a expressão de HSPB1 por imunistoquímica em amostras obtidas de tumores ovarianos, concluiu que a hiperexpressão da proteína é um fator independente de prognóstico, mesmo depois de 60 meses de seguimento dos pacientes.²⁶ Em geral, a maior parte dos estudos que envolveram correlação prognóstica fizeram a análise da expressão da proteína por imunistoquímica, ELISA ou Western-Blot.^{24,25,26,27,28}

No que diz respeito à relação da HSPB1 com resistência do tumor de ovário à platina, parece haver uma correlação positiva entre a expressão de HSPB1 e resistência à quimioterapia. Schneider e colaboradores (1998), utilizando imunistoquímica em amostras de tumor de ovário demonstraram que há coexpressão de HSPB1 e MDR1 (gene

de resistência a múltiplas drogas).²⁹ O gene *HSP60* é expresso constitutivamente na maioria das células e é regulada por outra chaperona, chamada HSP10. Ambas estão localizadas na mitocôndria. A expressão de HSP10 varia muito entre os pacientes com CO e sua hiperexpressão em pacientes tratados com platina parece conferir um pior prognóstico²¹. Kimura e colaboradores (1993) sugerem um papel para esta proteína na resistência à platina e hipertermia e correlacionam uma piora na sobrevida com o aumento da expressão da proteína.³⁰ Um estudo realizado em culturas de células de cabeça e pescoço mostrou uma correlação entre níveis de RNA mensageiro de *HSP60* e resistência à platina.³¹

A TRAP1 (receptor de fator de necrose tumoral associado a proteína 1) é uma proteína de choque térmico de 75-kd, com funções antiapoptóticas e antioxidantes, componente da via mitocondrial da apoptose. Dados preliminares sugerem que TRAP1 pode ser um biomarcador valioso no CO. Na verdade, os níveis desta proteína são significativamente superiores em linhagens de células de tumores ovarianos e em tumores ovarianos resistentes a platina. Ainda existem poucos dados sobre a relação desta proteína e prognóstico dos pacientes com CO^{33,34,35}.

2. Justificativa do Estudo

Atualmente, há um grande interesse clínico em procurar novos marcadores moleculares que funcionem como marcadores prognósticos e, ao mesmo tempo, preditivos de resposta à quimioterapia. Os desenhos dos tratamentos oncológicos, envolvem cada vez mais a biologia molecular para estabelecer múltiplas vias de ataque ao tumor. A abordagem terapêutica e a avaliação do prognóstico do paciente tornaram-se cada vez mais individualizadas, consequência da multiplicidade de subtipos moleculares que um determinado tipo de câncer pode apresentar.

Neste contexto, as proteínas de choque térmico são alvos promissores para desenvolvimento e testagem de novos agentes antineoplásicos. Os estudos já realizados na área, ainda são preliminares no que diz respeito ao entendimento dos mecanismos de resistência mediados por estas proteínas e o que elas representam na avaliação prognóstica das pacientes com CO. Como já foi explicitado, o CO, do ponto de vista molecular, é uma doença extremamente heterogênea. Diante deste fato, aumento na sobrevida livre de recaída e da sobrevida global são desejados e podem ser alcançados, à medida que o entendimento das vias de sinalização de apoptose seja cada vez mais ampliado.

A despeito dos poucos estudos existentes sobre a correlação do CO e as proteínas de choque térmico, os genes selecionados para esta pesquisa, dizem respeito àquelas cujas proteínas realmente já demonstraram papel prognóstico e/ou preditivo relevantes. Esta pesquisa proporcionará maior conhecimento sobre aspectos genético-moleculares do CO, em relação ao papel das proteínas de choque térmico, e representa um importante passo para o desenvolvimento de novos marcadores moleculares definidores de prognóstico e que podem ser utilizados como alvos terapêuticos em estudos futuros, com maior número de pacientes.

A proposta de um estudo com este perfil é aumentar o conhecimento sobre propostas já feitas em outros estudos, porém utilizando uma metodologia mais sensível (PCR quantitativa em tempo real - qRT-PCR) e estabelecer um elo entre o conhecimento gerado pela pesquisa translacional de bancada e a clínica da paciente.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a expressão dos genes *TRAP1*(*HSP 90*), *HSPB1*(*HSP27*), *HSPD1* (*HSP60*), *HSPA1L* e *HSPA1A*(*HSP70*) e correlacionar esta expressão com aspectos clínico e patológicos de pacientes com câncer de ovário.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão destes genes em pacientes com e sem diagnóstico de câncer de ovário sendo uma etapa inicial para validação de marcadores moleculares para o CO.
 - Comparar a expressão destes genes no tumor primário de ovário e no tumor metastático em pacientes com CO.
 - Associar o perfil de expressão gênica das amostras, com outros fatores prognósticos já conhecidos: estadiamento tumoral, doença residual após cirurgia ou quimioterapia, grau e subtipos histológicos.
 - Comparar a expressão dos genes com níveis de CA125 das pacientes com CO.
 - Correlacionar a expressão dos genes à sobrevida livre de recaída, e sobrevida global utilizando método de Kaplan-Meier.
-

4. Metodologia

4.1 – População em estudo

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Vera Cruz e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todas as pacientes (CAAE: 01242212.2.0000.5135) – ANEXO I.

Foram estudadas 51 pacientes, atendidas no Ambulatório de ginecologia e/ou oncologia do Hospital Vera Cruz, divididas em 4 grupos:

- Mulheres que tiveram diagnóstico patológico de CO inicial com proposta de tratamento cirúrgico e quimioterápico ou apenas tratamento cirúrgico (n=14)
- Mulheres que tiveram diagnóstico de CO metastático (n=11 - amostras pareadas)
- Mulheres que tiveram diagnóstico patológico de tumor benigno ovariano (cistoadenoma seroso) com proposta de tratamento cirúrgico (n=07)
- Mulheres sem evidências de neoplasia maligna ovariana (n=19), submetidas a ooforectomia por solicitação ou indicação em mulheres na pós-menopausa ou por alguma intercorrência cirúrgica que necessitou a retirada do órgão (por exemplo sangramento ativo), consideradas como controle neste estudo. Não foi realizada retirada de parte ou todo o ovário apenas para fins de estudo.

Critérios de elegibilidade

Critérios de Inclusão

- Mulheres com diagnóstico histológico de CEO ou cistoadenoma ovariano após tratamento cirúrgico.
 - Mulheres submetidas à ooforectomia sem evidências (após confirmação anátomo-patológica) de neoplasia maligna ovariana.
-

- Termo de consentimento livre e esclarecido (conforme ANEXO I) assinado em duas vias.

Crêterios de Exclusão

- Pacientes previamente tratadas com quimioterapia e/ou radioterapia.
- Pacientes com diagnóstico conhecido de AIDS.
- Pacientes com processo infeccioso em atividade diagnosticado ou não durante laparotomia.
- Indivíduos com diagnóstico ou histórico de outra neoplasia maligna.
- Pacientes com história de uso de imunossupressores, corticosteróides sist micos ou anti-inflamatórios não esteróides há pelo menos 3 meses.
- Não concordância em participar do estudo.

Descri o da Casuística

51 mulheres foram, prospectivamente, avaliadas em quatro diferentes grupos, como segue: CEO primário (n = 14), CEO metastático (n= 11) cistoadenoma seroso ovariano (n = 07) e ovário normal (n = 19), considerados como grupo controle nesta coorte. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de  tica do Hospital Vera Cruz, em Belo Horizonte, Minas Gerais e o termo de consentimento livre esclarecido foi obtido de todos os sujeitos antes do procedimento (ANEXO I e II) A participa o na pesquisa não implicou modifica es no tratamento proposto às pacientes, uma vez que apenas foram coletadas amostras de tecido no transoperatório para diagnóstico da doença. O tumor foi estadiado de acordo com as recomenda es da FIGO.⁴⁶

Nenhuma das pacientes foi previamente tratadas por quimio e/ou radioterapia ou apresentavam evidência   laparotomia de algum processo infeccioso agudo peritoneal. As pacientes com CEO foram submetidas   laparotomia e cirurgia de ressec o do tumor. O tecido ovariano normal foi obtido de pacientes submetidas   ooforectomia durante

histerectomia abdominal total para tratamento de doença ginecológica benigna (prolapso uterino, histeromioma, pólipos endometriais e cisto ovariano simples) por decisão do cirurgião baseado em achados e/ou intercorrências no intra-operatório. Foi realizado exame patológico em todas as amostras de tecido tumoral como rotina para fins de diagnóstico. A caracterização clínica de cada paciente está apresentada no ANEXO I. Após a excisão, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a extração de RNA

Justificativa do N amostral

A definição do N amostral proposto (51 pacientes) é compatível com número de casos atendidos no serviço no período (amostra de conveniência). Diferentemente dos estudos sobre tumores em outros sítios, a baixa prevalência dos tumores ovarianos e os determinantes éticos e biológicos para seleção do grupo controle constituem fator limitante do número de pacientes nos estudos sobre CEO.

4.2 – Processamento das amostras teciduais

Realizou-se todas as atividades experimentais no Serviço de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias, obedecendo todas as regras de biossegurança estabelecidas pelo laboratório e seguindo o fluxo de atividades descrito na Figura 1.

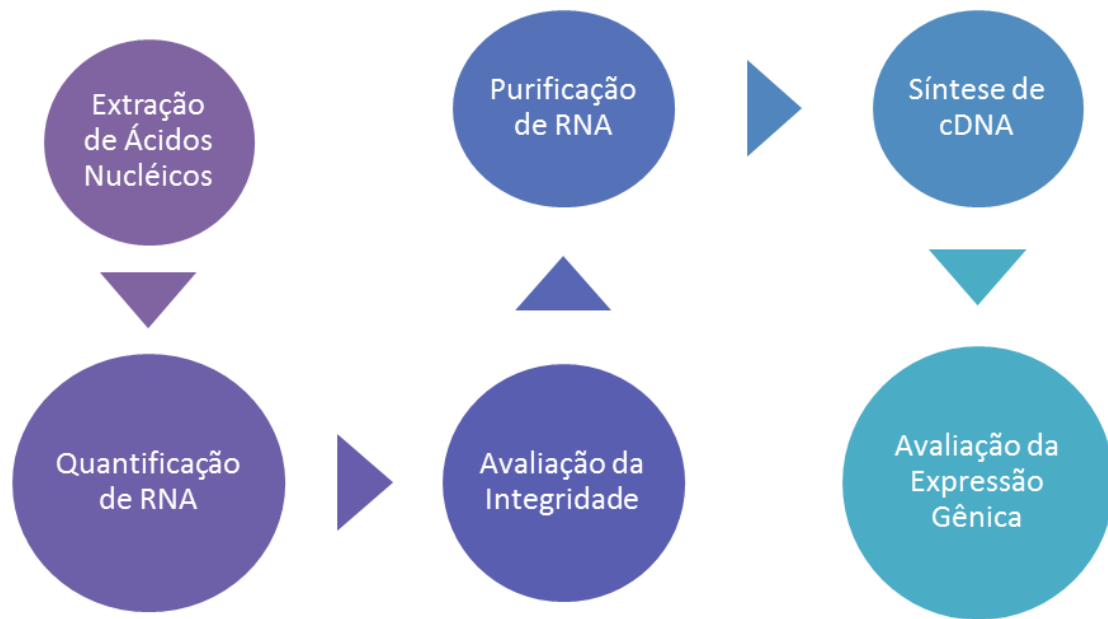


Figura 1. Fluxograma Geral de Atividades

4.2.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA, macerou-se aproximadamente 100 mg de tecido e adicionado 1mL de Trizol® (Invitrogen TM, USA), conforme as orientações do fabricante. Após a homogeneização do macerado com o reagente, incubou-se por 5 minutos a 30°C em banho seco e posteriormente centrifugou-se por 15 minutos a 12.000g em centrífuga refrigerada a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante formado após a centrifugação para novo microtubo. Neste novo microtubo, adicionou-se 200µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente no vórtex, por aproximadamente 15 segundos. Posteriormente, incubou-se as amostras por 3 minutos a 30°C, em banho seco. Após a incubação, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 12.000 g em centrífuga refrigerada a 4°C. Desta centrifugação formou-se, por diferença de densidade das substâncias, três fases, sendo a primeira fase contendo o RNA, a segunda fase contendo proteínas e a terceira fase contendo o DNA. Retirou-se a primeira fase contendo o RNA e transferiu-se para um novo microtubo, no qual adicionou-se 500µL de isopropanol. A segunda fase contendo proteínas e a terceira fase contendo o DNA e proteínas foram armazenadas no freezer -80° C para novos estudos. Posteriormente, incubou-se o novo microtubo contendo RNA e isopropanol por 10 minutos a 30°C, em banho seco. Centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos em centrífuga

refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e iniciou-se o processo de lavagem com etanol 75%. Após a lavagem, deixou-se o precipitado secar por aproximadamente 15 minutos e ressuspendeu-se o mesmo em água previamente tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). Obteve-se assim, o RNA total do tecido ovariano, e o mesmo foi armazenado a - 80°C.

4.2.2 Quantificação de RNA

Quantificou-se o RNA total extraído em espectrofotômetro de microvolume Nanovue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life, USA) utilizando-se 2 µL da amostra. Avaliou-se os seguintes parâmetros na quantificação: Concentração na Absorbância a 260nm, Absorbância a 280nm e Razão das Absorbâncias 280/260. Considerou-se a relação (260/280) das densidades ópticas (OD) igual ou maior que 1,7, como referência de boa qualidade para uso.

4.2.3 Avaliação da Integridade do RNA

Avaliou-se a integridade do RNA total extraído através de Eletroforese em gel de Agarose 1%. Pesou-se 0,50g de Agarose e diluiu-se em 50mL de TBE 1X. Adicionou-se 2,5mL de Brometo de Etídio e deixou-se a solução solidificar no suporte para o gel com o pente de canaleta inserido. Preparou-se as amostras para aplicação no gel, com os seguintes parâmetros: 0,5µg de RNA, 5µg de tampão de amostra e água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para um volume final de 10µg. Aqueceu-se as amostras preparadas em banho seco por 3 minutos a 60°C. Após a solidificação do gel, retirou-se o pente de canaletas e posicionou-se o mesmo na cuba de eletroforese. Encheu-se a cuba com TBE 1X e aplicou-se as amostras em cada canaleta. A eletroforese foi realizada submetendo o gel a uma voltagem de 100 volts durante 40 minutos.³⁷ Após a corrida, fotografou-se o gel em transiluminador e verificou-se a presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal íntegras e sem arraste.

4.2.4 Tratamento do RNA com DNase

Tratou-se 2µg de RNA total com o kit RNase-Free DNase Set® (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Acrescentou-se em um microtubo 2µg de RNA total, 2µL de tampão e 0,2µL de DNase. Completou-se o volume com água tratada com DEPC em quantidade suficiente para 20µL. Incubou-se por 30 minutos, a 37°C, e em seguida, por 5 minutos a 65°C. Após as incubações, armazenou-se o RNA total purificado a -80°C.

4.2.5 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Utilizou-se o RNA total purificado e íntegro para realizar a síntese do cDNA a partir do RNA mensageiro utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase® (Sigma), conforme as orientações do fabricante. Realizou-se o procedimento de síntese de cDNA em câmara de fluxo unidirecional, previamente limpa com gaze embebida com álcool 70%, assim como todos os materiais como micropipetas, caixas de ponteiras, frascos e suportes. Após esse procedimento, deixou-se todos os materiais expostos à luz UV por 20 minutos. Identificou-se os tubos utilizados de acordo com as amostras de RNA. Misturou-se os reagentes o Buffer e a enzima em tubo estéril sobre o suporte de resfriamento Coolbox (Biocison). Sintetizou-se 25µL de cDNA e 25µL de controle de contaminação com DNA genômico, no qual não foi incluída a enzima, NORT. Adicionou-se em cada microtubo identificado com o nome da amostra, os volumes de DNTP Mix e Oligo d(T). Em outra câmara de fluxo unidirecional exclusiva para template, adicionou-se o volume para 1µg de RNA total cada microtubo contendo DNTP e Oligo d(T) e homogeneizou-se por pipetagem. Aqueceu-se tais microtubos em banho seco por 10 minutos a 70°C. Retirou-se as amostras do banho seco e adicionou-se o máster mix e, novamente incubados por 30 minutos a 37°C e, em seguida, por 5 minutos a 65°C. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

4.2.6 Obtenção da amostra calibradora para os ensaios de expressão gênica

Homogeneizou-se quantidades equivalentes de 11 amostras de cDNA de ovário normal para constituir um Pool de Ovários Normais. Realizou-se o mesmo procedimento

com as amostras de NORT correspondentes para constituir um Pool NORT de Ovários Normais.

4.2.7 Avaliação da Expressão Gênica

Avaliou-se a expressão dos genes *TRAP1(HSP90)*, *HSP27 (HSPB1)* e genes da sua família *HSPA1A*, *HSPAIL (HSP70)* e *HSPD1(HSP60)*, através de PCR Quantitativa em Tempo Real usando sondas Taqman® e TaqMan® Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific™ cat.4304437), conforme especificações do fabricante (Figura 2). A concentração de cada cDNA por reação foi de 40 ng. Foram utilizados como controles endógenos os genes *TBP* e *18S* e como calibrador da reação o Pool de Ovário Normal obtido conforme item 4.2.6. O volume final de cada reação foi de 20 µL em uma placa de 96 poços contendo as amostras de cDNA, em duplicata, com seus respectivos NORT's, o Pool de Ovários Normal, também em duplicata, e seu respectivo NORT. Os controles NoRT e NTC foram incluídos no estudo para monitorar contaminação por DNA genômico e dos reagentes, respectivamente. A amplificação e coleta de dados foi realizada pelo equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) de acordo com a ciclagem estabelecida pelo fabricante (Figura 2).

Reação de qPCR Taqman® - Projeto CEO (PLACA 1)

TOTAL DE AMOSTRAS	TOTAL DE ALVOS	SOBRAS	REAÇÕES/ALVO	POÇOS/ALVO	NTC	TOTAL DE POÇOS
5	6	2	30	16	6	96

qPCR TaqMan®				
REAGENTES	[] / ESTOQUE	[] / REAÇÃO	VOL/REAÇÃO [μL]	VOL TOTAL [μL]
TaqMan® Gene Expression Assay	20x	1x	1,0	18
TaqMan® Gene Expression Master Mix	2x	1x	10,0	180
Template	40 ng/μL	40ng	1,0	
Água RNase Free	-	-	8,0	144
Volume final			20	

*OBS: Fazer uma mix como descrito acima para cada alvo/sonda

CICLAGEM (StepOne ou StepOnePlus Real-Time PCR System):				
50°C	02 minutos			
95°C	10 minutos			
95°C	15 segundos	} 40 ciclos		
60°C	01 minuto			

Figura 2: Desenho da reação de qRT-PCR e condições de ciclagem.

4.3 – Análise dos dados

É um estudo prospectivo observacional. A expressão gênica foi quantificada pelo método $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct) e a quantificação relativa (RQ) foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este método analisa as mudanças na expressão gênica da amostra tumoral para o gene de interesse em relação a amostra normal (também chamada de calibradora ou amostra de referência), considerando o controle endógeno como normalizador. Assim, é possível verificar a subexpressão ou superexpressão dos genes alvo.⁴⁷

Na análise descritiva das variáveis de caracterização foram utilizadas as frequências absolutas e relativas. Já na descrição dos itens dos constructos e dos indicadores foram utilizadas medidas de posição, tendência central e dispersão.

Para analisar a comparação entre os genes e as variáveis qualitativas foram utilizados os testes de t de Student e a ANOVA (Montgomery et al., 2012). Já para

averiguar a correlação entre os genes e a sua comparação com as variáveis quantitativas foi utilizada a correlação de Pearson e a correlação de Spearman (Hollander e Wolfe, 1999), respectivamente. Tanto a correlação de Pearson, quanto a correlação de Spearman é uma medida limitada entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo o coeficiente estiver de -1 maior a correlação negativa e quanto mais próximo o coeficiente estiver de 1 maior a correlação positiva. Uma correlação de Pearson ou de Spearman não significativa representa um coeficiente de correlação estatisticamente igual à zero, ou seja, não existe correlação entre as duas variáveis testadas.

Para comparar as curvas do tempo livre da doença e as curvas da sobrevivência com as expressões gênicas foi utilizado o teste de Log Rank (Colosimo e Giolo, 2006). Vale destacar que as expressões gênicas foram recodificadas como maior que 1 e menor ou igual a 1.

Para analisar os fatores que exercem influência sobre a sobrevida e o tempo livre da doença foi realizada uma análise univariada via Modelo de Regressão de Cox (Colosimo e Giolo, 2006), sendo computada a Razão de Risco (Colosimo e Giolo, 2006). O Modelo de Cox, diferente da regressão logística, tem a vantagem de incluir o efeito do tempo até a ocorrência da morte e da recaída, respectivamente, na análise, além de possibilitar a interpretação através da razão de risco e não pela razão de chance.

O software utilizado nas análises foi o R (versão 3.4.1). Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

As interações entre as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos foram avaliadas *in silico* pelo banco de dados de cadeia de caracteres livremente disponível [Szkarczyk, et al; 2015], para identificar as categorias de ontologia genética e/ou caminhos que podem ser super representados. Os dados foram extraídos de bases de curadoria (biokart, BioCyc, go, KEEG) e experimentalmente determinado (BIND, DIP, grade, HPRD, IntAct, MINT, PID). Os dados da rede tinham 90% de nível de confiança.⁴⁵

4.4 – Quantificação e análise da qualidade dos ácidos nucléicos obtidos das amostras de tecidos ovarianos

As amostras extraídas foram quantificadas a partir da análise espectrofotométrica usando os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, a relação 260/280 nm, também foi calculada a fim de avaliar a pureza (Tabela ??). – A maioria dos resultados foi satisfatória em termos de qualidade e concentração. A relação entre as OD obtidas para as amostras de RNA apresentou-se entre 1,7 e 2,2 , considerado de boa qualidade para uso. A dureza de alguns tumores constituiu um fator limitante nas etapas iniciais de maceração e reduzindo o rendimento das amostras.

A integridade do RNA extraído das amostras foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 1%, cujos perfis apresentam dois fragmentos correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S, indicando a obtenção de qualidade satisfatória do RNA para as amostras. A Figura 3 representa os resultados do perfil eletroforético para 11 casos como representativos dos resultados obtidos. Embora existam evidências de degradação parcial em alguns casos, as bandas 18S e 28S ainda são bem marcantes.

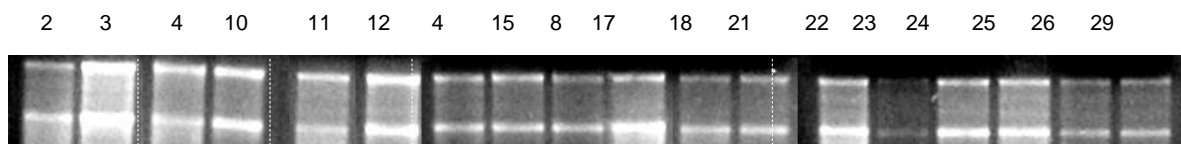


Figura 3 – Integridade do RNA extraído em amostras de pacientes com CEO.

A integridade do RNA foi confirmada em gel de agarose 1%. Observa-se a presença de duas bandas correspondentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico confirmando a integridade do RNA em cada extração. As amostras estão identificadas nas respectivas canaletas. As linhas pontilhadas separam resultados obtidos em diferentes experimentos. A figura representa um dos resultados obtidos.

4.5 – Ensaio de PCR quantitativa em tempo real para avaliação da expressão gênica

Um dos pontos críticos nos experimentos de qRT-PCR é a seleção de genes normalizadores ideais para interpretar os dados gerados. Alguns estudos revelaram que os níveis de expressão de alguns genes de referência comumente usados nem sempre permanecem invariáveis em diferentes tecidos e tipos de linhagens celulares, assim como em diferentes condições fisiológicas e patológicas, como idade, grau e estágio do tumor.³⁸ Diante disso, a escolha dos genes *TBP* e *18S* como normalizadores mais estável para os estudos de quantificação da expressão gênica em CEO foi realizada anteriormente realizada no Serviço de Biologia Celular por meio de comparações da estabilidade de seis genes normalizadores candidatos (18S, ALAS, GAPDH, SDHA, TBP e TFRC) selecionados do Human Reference Gene Panel (Roche Applied Science) (dados não mostrados). Foram adquiridas sondas para os cinco alvos selecionados como normalizadores e os ensaios de qRT-PCR foram realizados.

A Figura 4 mostra a curva de amplificação obtidas para esses alvos usando as amostras de tecido ovariano normal e tumoral.

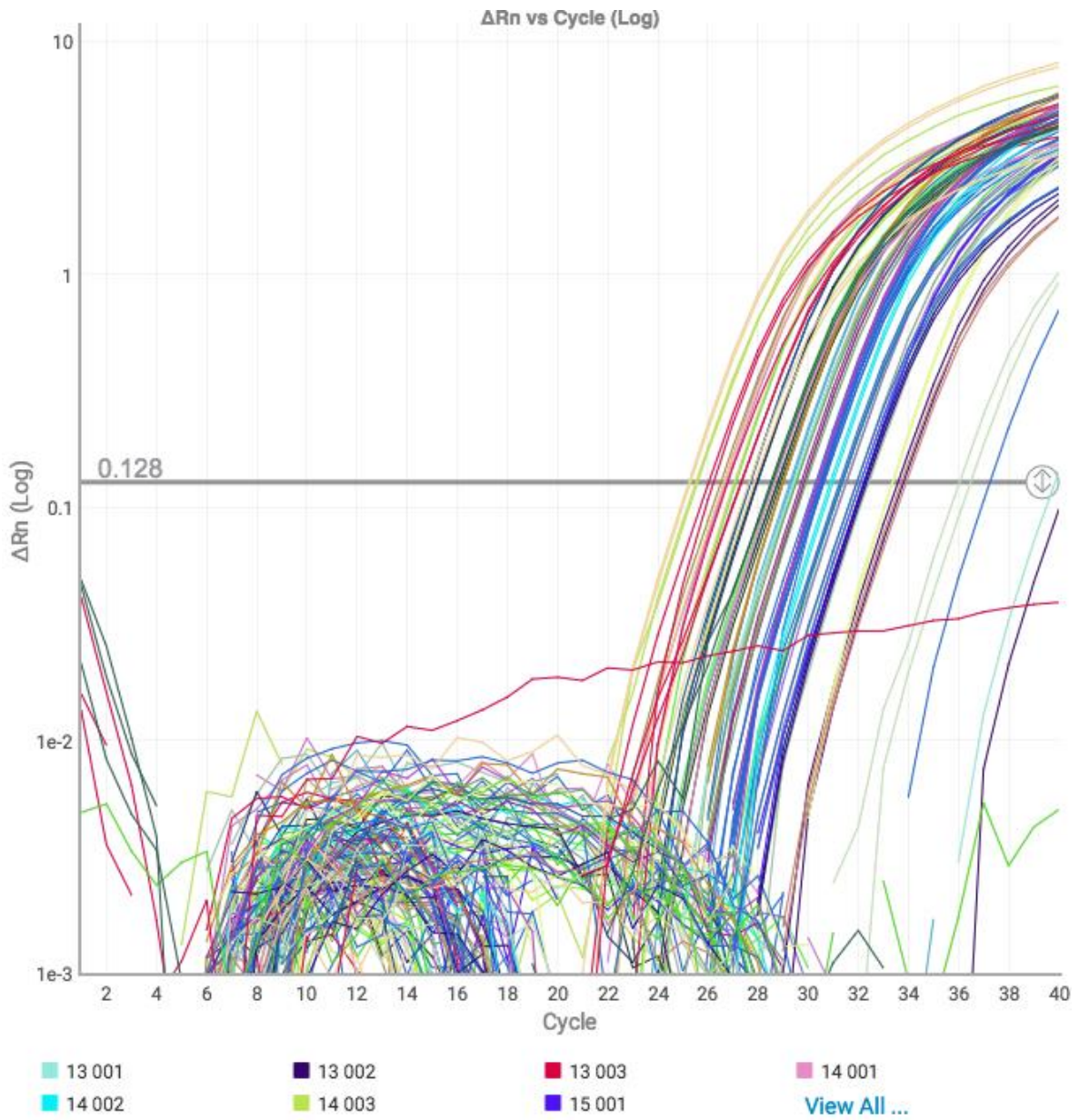


Figura 4 – Curva de ampliação

Após seleção dos genes normalizadores, o próximo passo foi a realização a realização dos ensaios de qRT-PCR para determinação da expressão dos genes da família de proteínas Heat Shock .

Figura 5 Curvas de amplificação dos genes TBP (A) e 18S (B) para as amostras de tecido ovariano normal e tumoral.

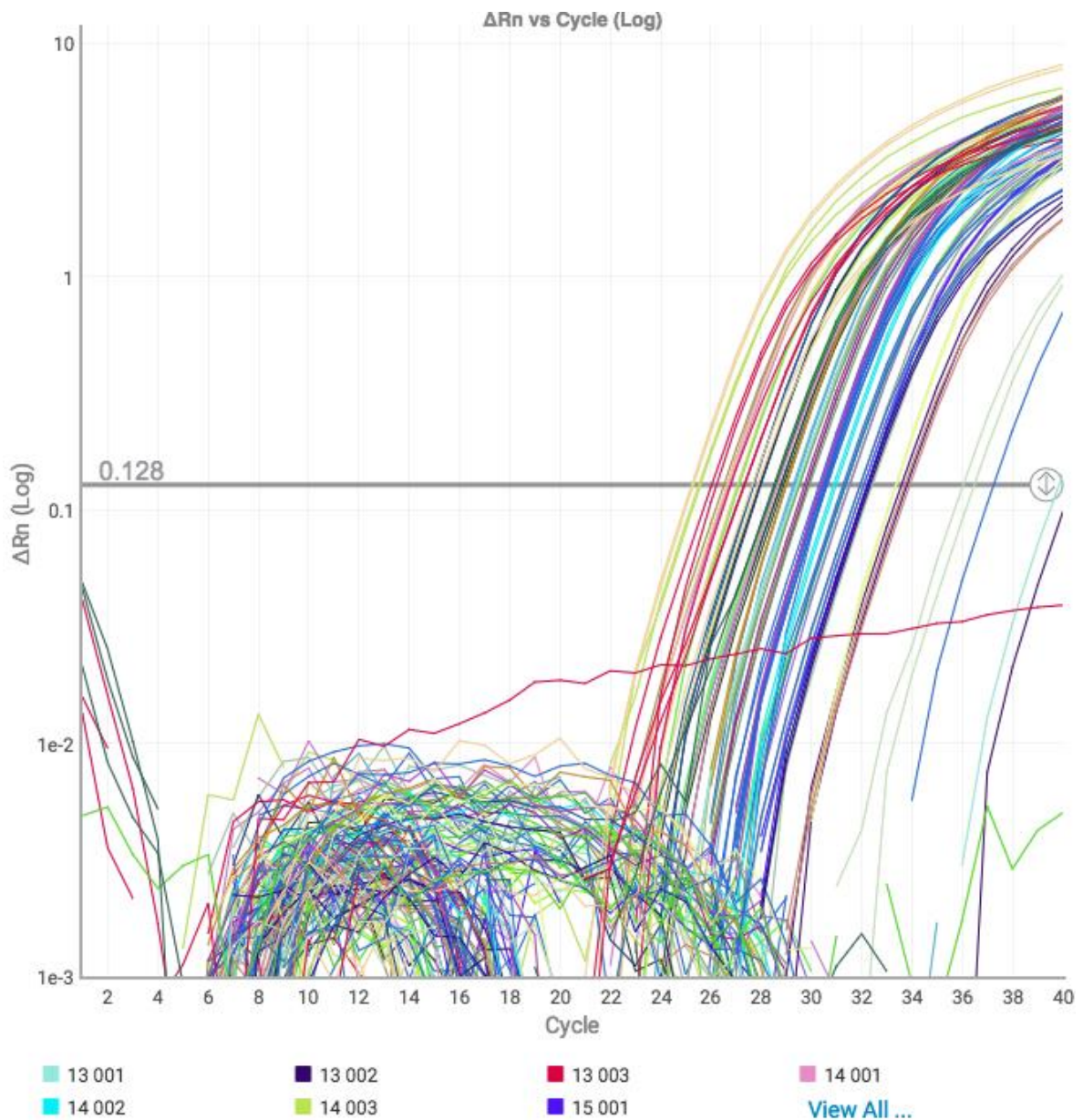


Figura 5 – Curva de expressão

4.6 Análise in silico da rede de interação dos genes

Análise in silico da rede de interação foi realizada em banco de dados STRING, evidenciando interações entre as proteínas codificadas pelos genes analisados neste estudo. Além disso os processos biológicos das proteínas entre os genes analisados STAT3 revelou suas funções na proliferação e na via de sinalização anti apoptótica

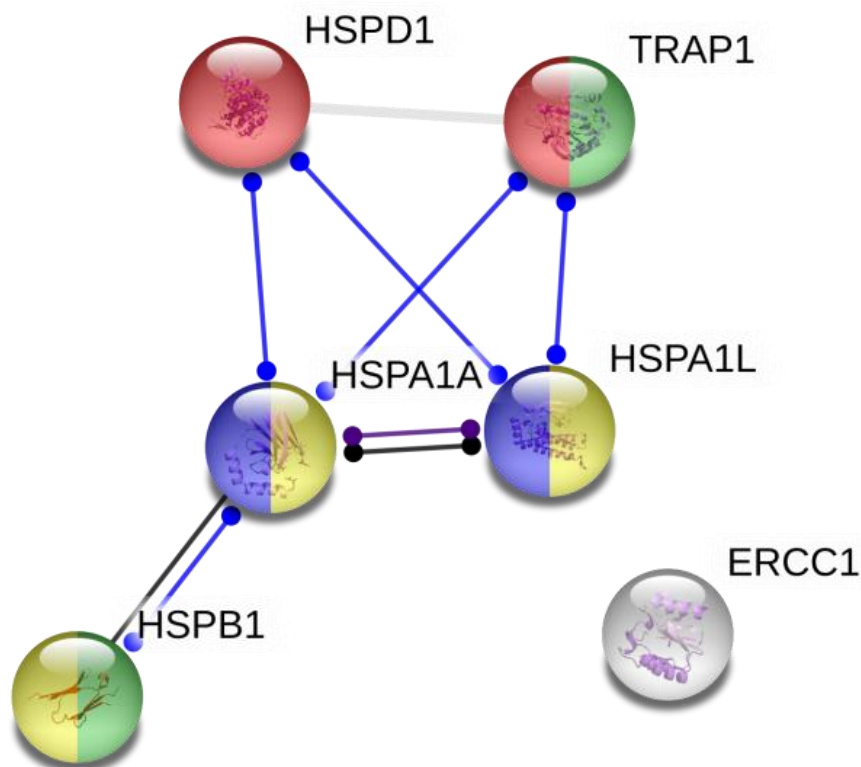


Figura 6 – Análise de Rede do banco de Dados STRING

Legenda:

Vermelho –Chaperone mediated protein folding

Verde- negative regulated of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathyway

Amarelo- MAPK signaling pathway

Roxa - Spliceossoma

Após análise do STRING , observou se que não havia relação entre as Proteínas de Choque Térmico e o ERCC1. Sendo assim, não foi avaliado a expressão deste gene. Os resultados da expressão gênica serão apresentado no artigo.

5. Referências Bibliográficas

1. Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 2011;59:225-249.
 2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil: Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> (acesso em: 04/11/2011)
 3. Cannistra, SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 351:2519-29.
 4. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implication for biomarkers studies. *PLoS Med* 2008; 5:e232.
 5. Tothill RW, Tinker AV, George J, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5198-208
 6. Hess V, A`Hern R, Nasiri N, et al. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol* 2004;22:1040-4.
 7. Linasmita V, Pattaraarchachai J, Daengdeelert P. Prognostic factors for survival of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004;85(1):66-69.
 8. Agarwal R, Kaye SB. Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? *Ann Oncol* 2005;16(1):4-6.
 9. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, et al. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovarie (GINECO). *Cancer* 2009;115:1234-44.
-

-
10. Chan JK, Tian C, Monk BJ, et al. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 2008;112:2202-10.
 11. Fader AN, Rose PG. Role of surgery in ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:2873-83.
 12. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002;20:1248-59.
 13. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;334:1-6
 14. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194-200.
 15. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194-200.
 16. du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, et al. A Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1320-30.
 17. Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9:389-93.
-

-
18. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 81: 15-27.
 19. Garrido C, Brunet M, Didelot C, et al. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006;5:2592-601.
 20. Beere, HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science* 2004;117:2641-2651.
 21. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress e Chaperones* 2005; 10(2), 86-103.
 22. Pfister K, Radons Jürgen, Busch R, et al. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):926-35.
 23. Elstrand MB, Kleinberg L, Kohn EC, Trope CG, Davidson B. Expression and clinical role of antiapoptotic proteins of the bag, heat shock, and Bcl-2 families in effusions, primary tumors, and solid metastases in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:54-62.
 24. Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, et al. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:1603-9.
 25. Olejek A, Damasiewicz-Bodzek A, Bodzek P, Wielkoszyński T, Zamłyński J, Stołtny P, Skutil M. Concentrations of antibodies against heat shock protein 27 in the sera of women with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(9):1516-20.
 26. Korneeva I, Bongiovanni AM, Girotra M, Caputo TA, Witkin SS. Serum antibodies to the 27-kd heat shock protein in women with gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:18-21.
-

-
27. Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, Geisler HE, Miller GA, Zhou Z, Wiemann MC. HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004;25(2): 165-8.
 28. Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, De Vries EG, Kampinga HH, Van der Zee AG. Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int J Cancer* 1999;84(3):234-8.
 29. Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Marx D, Meden H. Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. *Anticancer Res* 1998;18:1967-71.
 30. Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-KD heat-shock protein HSP-60. *J Clin Oncol* 1993;11:891-8.
 31. Nakata B, Barton R, Robbins K, Howell S, Los G. Association between hsp60 messenger-RNA levels and Cisplatin resistance in human head and neck-cancer cell-lines. *Int J Oncol* 1994;5:1425-32.
 32. Cohen M, Dromard M, Petignat P. Heat shock proteins in ovarian cancer: A potential target for therapy. *Gynecol Oncol* 2010;119:164-166.
 33. Costantino E, Maddalena F, Calise S, Piscazzi A, Tirino V, Fersini A, Ambrosi A, Neri V, Esposito F, Landriscina M. TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009;279:39-46.
 34. Landriscina M, Amoroso MR, Piscazzi A, Esposito F. Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: The mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol* 2010;117:177-182.
-

-
35. Macleod K, Mullen P, Sewell J, et al. Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65:6789-6800.
 36. Singh MK, Sharma B, Tiwari PK. The small heat shock protein Hsp27: Present understanding and future prospects. *Journal of Thermal Biology*. 2017 Jun 7; 69:149-154
 37. Sambrook J, Russel DW. *Agarose Gel Eletroforesis*. CSH Protocols, 2006 doi:10.1101/pdb.prot4020
 38. Li Y. et al Inactivation of Nuclear Factor KB by Soy Isoflavone Genistein Contributes to increased Apoptos Induced by Chemotherapeutic Agents Human cancer Cells. *Cancer Res* 2005 August, 65: (15)
 39. Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway protein as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2005;10:5386-5403.
 40. Landen Jr CN, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian câncer. *J Clin Oncol*, 2008;20:995-1005.
 41. Liu RL, Opiari AW, Tan L, et al. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian câncer: implications for chemoresistance. *Cancer Res* 2002;62:924-931
 42. Têtu B, Popa I, Bairati I, L'Esperance S, et al. Immunohistochemical analysis of possible chemoresistance markers identified by micro-arrays on serous ovarian carcinomas. *Modern Pathol* 2008;21:1002-1010.
 43. Fu J, Bian L, Zhao L, Dong Z, et al. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues.
-

-
44. Kurman , RJ; Shin, Le ming The origin and pathogenesis of Epithelial ovarian cancer – a proposed unifying theory [Am J Surg Pathol](#). 2010 Mar; 34 (3): 433-43. doi: 10.1097 / PAS.0b013e3181cf3d79.
 45. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: Database issue D447–D452
 46. FIGO, International Federation of Gynecology Obstetrics. Clinical practice guidelines; 2009.
 47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25 (4):402-8
 48. Heinrich JC, Tuukkanen A, Schoroeder M, Fahrig T and Fharig R: RP101 (brivudine) binds to heat shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1349-1361, 2011.
 49. Amoroso MR, Matassa DS, Agliarulo I, Avolio R, Lu H, Sisinni L, Lettini G, Gabra H, Landriscina M, Esposito F. TRAP1 downregulation in human ovarian cancer enhances invasion and ephitelial-mesenchymal transition. *Official Journal of the Death Differentiation Association*. Citation: *Cell Death and Disease* 2016 7, e2522; doi: 10.1038/cddis.2016.400
 50. Friedlander M. et al Clinical Trials in recurrent ovarian Câncer. *Int Gynecol Cancer* 2011 May, 21(4) 771-5.
 51. Wang X, Meijuan C, Zhou J, Zhang X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical câncer therapy (Review). *Int Journal of Oncology*. 2014 Feb 27;45:18-30.
-

-
52. Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. 2014 Oct 06;5(346):1-5.
 53. Kapoor C, Vaidya S. Heat shock protein (HSP) and cancer: An overview. Am. J. Med. Dent. Sci. 2013, 1(1):31-34, doi:10.5251/ajmds.2013.1.1.31.34.
 54. Bobrov E, Skobeleva N, Restifo D, Beglyarova N, Cai KQ, Handorf E, Campbell K, Proia DA, Khazak V, Golemis EA, Astsaturov I. Targeted delivery of chemotherapy using HSP90 inhibitor drug conjugates is highly active against pancreatic cancer models. Oncotarget, 2017; 8(3):4399-4409
 55. Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. Fibrogenesis & Tissue Repair. 2012; 5:1-7
 56. Owen S, Zhao H, Dart A, Wang Y, Ruge F, Gao Y, Wei C, Wu Y, Jiang WG. Heat shock protein 27 is a potential indicator for response to *YangZheng XiaoJi* and chemotherapy agents in cancer cells. Int. J. of Oncology. 2016;49:1839-1847
 57. Stope MB, Wiegank L, Weiss M, Diesing K, Koensgen D, Burchardt M, Zygmunt M, Mustea A. Drug-induced Modulation of Heat Shock Protein HSPB1 in an Ovarian Cancer Cell Model. Anticancer Research. 2016; 36:3321-3328
 58. Kampinga HH, Garrido C. HSPBs: Small proteins with big implications in human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012; 44:1706-1710
 59. Stope MB, Koensgen D, Burchardt M, Concin N, Zygmunt M, Mustea A. Jump in the fire – heat shock proteins and their impact on ovarian cancer therapy. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2016; 97:152-156
-

-
60. Aust S, Bachmayr-Heyda A, Pateisky P, Tong D, Darb-Esfahani S, Denkert C, Chekerov R, Sehouli J, Mahner S, Gorp TV, Vergote I, Speiser P, Horvat R, Zeillinger R, Pils D. Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer – A study of the OVCAD consortium.. *Molecular Cancer*. 2012; 11:69
doi:10.1186/1476-4598-11-69

 61. Stope MB, Wiegank L, Weiss M, Diesing K, Koensgen D, Burchardt M, Zygmunt M, Mustea A. Drug-induced Modulation of Heat Shock Protein HSPB1 in an Ovarian Cancer Cell Model. *Anticancer Res*. 2016 Jul; 36(7):3321-7

 62. Cappello F, Di Stefano A, David S, Rappa F, Anzalone R, La Rocca G, D'Anna SE, Magno F, Donner CF, Balbi B, Zummo G. Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Cancer Society*. 2006 Nov 15; 107:2417-2424
doi:10.1002/cncr.22265

 63. Stope MB, Klinkmann G, Diesing K, Koensgen D, Burchardt M, Mustea A. Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation. *Dis. Makers*. 2017, 2017:
-

6. Artigo

Under-expression of HSPA1A, HSPA1L and TRAP1 genes could help predict disease prognosis in ovarian epithelial cancer

Under-expression of *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* genes could help predict disease prognosis in ovarian epithelial cancer

Warne Pedro de Andrade^{1,2*}; Letícia da Conceição Braga^{2,3}; Nikole Gontijo Gonçalves³, Luciana Maria Silva³, Agnaldo Lopes da Silva Filho^{2,4}

¹ *Hospital Vera Cruz, Belo Horizonte, Brazil*

² *Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil*

³ *Serviço de Biologia Celular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brazil*

⁴ *Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

*Corresponding author: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Escola de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, Brazil. E-mail address: warne800@hotmail.com (W.P. Andrade).

ABSTRACT

Heat Shock Proteins (HSPs) are produced in response to pathophysiological stress and take part in several stages of carcinogenesis, acting primarily as anti-apoptotic agents. They are also implicated in resistance to chemotherapy in several tumors. Herein we correlated the expression of HSP genes and the clinical and pathological aspects of patients with ovarian cancer (OC). METHODS: the 51 patients included were divided into four groups: primary Epithelial Ovarian Cancer (EOC; n = 14), metastatic EOC (n = 11), ovarian serous cystadenoma (n = 7), and no evidence of ovarian malignancy or control (n = 11). The 57 tumor samples obtained were submitted to RNA extraction and reverse transcription. qRT-PCR was performed to compare the expression of *TRAP1*, *HSPB1*, *HSPD1*, *HSPA1A* and *HSPA1L* in primary and metastatic EOCs, considering normal ovary as control. Expression of the *TRAP1*, *HSP27*, *HSP60*, *HSP70*, and *HSPA1L* genes did not differ among the groups (p-value>0.050). *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* were under-expressed in the primary and metastatic EOC groups with *HSPA1L* showing the lowest expression. *TRAP1* expression was higher in tumors at stages I/II than at III/IV. Grade II subjects showed higher *HSPB1* expression. There was no correlation between HSPs expression and age, menarche, parity, period after menopause initiation and CA-125. *HSPA1A* gene was negatively correlated with the risk of dying of OC. There was no correlation between the expression of the HSP genes evaluated and overall and disease-free survival. We suggest that downregulation of *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* could help the evaluation of the clinical prognosis of women with EOC.

Key words: Ovarian cancer, prognosis, resistance to chemotherapy, heat shock proteins, TRAP1, HSPA1A, HSPA1L, HSPD1, HSPB1

1. INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) causes around 125,000 deaths globally per year [1]. Approximately 70% of women with ovarian cancer (OC) are diagnosed with locally advanced or metastatic disease (stages III/IV), of whom only ~30% will survive more than 5 years. By contrast, women diagnosed with earlier stage (stage 1) disease have a 5-year survival rate >90%. Unfortunately, signs and symptoms of OC are usually absent or too subtle to be easily detected in the early stages of the disease. Despite of high initial response rates to chemotherapy of approximately 80% most women with advanced OC relapse within 2 years after initial drug treatment and ultimately die of the disease [2-4].

The standard treatment for EOC involves maximal cytoreductive surgery followed by platinum and taxane-based chemotherapy. At first, most patients with advanced stage (III/IV) EOC respond well to surgery and chemotherapy; however, within two years after initial treatment, cancer frequently relapses with a drug-resistant phenotype and most patients die of the disease [5-7]. Age and disease staging at diagnosis, tumor histology, and performance status (PS) are the best known prognostic factors [8], albeit limited by our restricted understanding of EOC's biology and complicated by disease heterogeneity.

Currently, there is a growing interest in finding specific molecular markers that could function both in the prognosis of the disease and the patient's response to chemotherapy. Good candidates include heat shock proteins (HSPs) because of their role in facilitating malignant transformation, tumor progression, and tumor survival [9,10]. These evolutionarily conserved proteins are classified according to their molecular weight and, in mammalian cells, are grouped into six main classes: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, and HSP110 [11]. The contribution of HSPs to tumorigenesis can be attributed to their activities governing folding/unfolding, turn-over, and transport of client proteins as well as assembly of multiprotein complexes. As a result, various crucial and clinically important cell responses are vitally influenced and modulated by HSPs, e. g. cell growth, apoptosis, metastasis, and treatment resistance [9,10].

Although the existing data for HSP's function in OC progression and drug resistance is appealing, it is still limited and conflicting at times. For instance, the

cytosolic HSPB1(HSP27), HSP70 (HSPA1A,HSPA1L), and HSP90(TRAP1) as well as the mitochondrial HSP60 proteins and the tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP-1) have all been shown to be induced by drug treatment and frequently associated with cross-resistance to anticancer compounds of different classes in ovarian and other cancer types [9, 12-19]. However, a previous study did not find any correlation of HSP27 with clinical and pathological characteristics of OC including International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging, grade, histotype, and p53 status [20]. Moreover, the levels of circulating HSP27 protein were decreased after chemotherapy treatment in metastatic OC patients [21]. Thus, drug-mediated regulation of HSPs in OC may follow differentially controlled stress signaling pathways. Due to our limited understanding of HSP's role in OC biology, studies elucidating their potential to help the prognostic evaluation of patients and the therapeutic strategy upon relapse after platinum-based chemotherapy are warranted.

In the present study, we correlated the expression of *TRAP1*, *HSPB1*, *HSPA1*, *HSPAL*, and *HSPD1* genes and the clinical and pathological aspects of patients with OC. To this end, we compared the expression of these genes in the primary and metastatic ovarian tumor and investigated the relationship between the observed expression profile with other known prognostic factors and with the patients' response to chemotherapy and relapse-free survival.

2. METHODS

2.1 Ethics

This study was approved by the Research Ethics Committee of Vera Cruz Hospital, Belo Horizonte, Brazil, under the protocol CAAE: 01242212.2.0000.5135. All participants voluntarily signed an informed consent form.

2.2 Patients and tumor tissue samples

We collected ovarian tissue from 51 women divided into four groups: primary Epithelial Ovarian Cancer EOC (n=14), ovarian serous cystadenoma (n=7) and normal ovary (n=19). The patients included in the study did not match any of the following exclusion criteria: previously treated with chemotherapy and / or radiotherapy; HIV positive; presenting any infectious process diagnosed or not during laparotomy; present or previous history of other malignant neoplasms; using or with a previous history of use of immunosuppressives, systemic corticosteroids or non-steroidal anti-inflammatory drugs in the three months prior to the study.

In the EOC patients, samples were collected from primary tumors and of metastatic tumors, when extra pelvic disease above 1 cm was observed. Tumor staging was performed according to the FIGO recommendations [22]. Normal ovarian epithelial tissue samples were taken from postmenopausal women who required a bilateral oophorectomy. After excision, the samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

2.3 RNA extraction, cDNA synthesis, and gene expression analysis

Total RNA was extracted from 50-100 mg of each ovarian tumor sample using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA yield and A260/280 ratio were determined by a Nanovue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life, USA). RNA integrity and quality were characterized through 1% agarose gel electrophoresis. Subsequently, the samples were treated with RNase-Free DNase Set® (Qiagen) to remove possible traces of genomic DNA.

cDNA was synthesized using M-MLV Reverse transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's recommendations. The qRT-PCR was performed using Inventoried assays (TaqMan® Assays - Applied Biosystems) according to manufacturer's recommendation. TATA Binding Protein (TBP) were used as endogenous controls. Each 40-cycle reaction was performed in duplicate. A sample without a template

was included as a control in each assay. Relative gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method [23]. Two technical replicates were adopted for each sample.

2.4 Gene functional and Network pathway analysis

The interactions between the proteins encoded by the differentially expressed HSP genes were evaluated *in silico* by the freely available STRING database [24] to identify the categories of genetic ontology and / or paths that can be overrepresented. The data were extracted from curated databases (Biokart, BioCyc, go, KEEG) and experimentally determined (BIND, DIP, grid, HPRD, IntAct, MINT, PID). The network data had a 90% confidence level [24].

2.5 Statistics

Student's t-test and ANOVA were used to compare gene expression and qualitative variables [25]. To detect correlation between the genes and to compare their expression with the quantitative variables, we used Pearson's correlation and Spearman's correlation [26], respectively. To compare disease free time curves and survival curves with gene expression, the Log Rank test [27] was used. It is worth mentioning that the gene expressions were recoded as greater than 1, less than 1, or equal to 1. To analyze the factors influencing survival and the disease-free interval, a univariate analysis was performed using the Cox Regression Model and the Risk Ratio was computed [27]. Different from logistic regression, the Cox model has the advantage of including the effect of time up to the death and relapse besides allowing the interpretation through the risk ratio and not the odds ratio. The probability of survival and significance were calculated using the Kaplan-Meier method [28]. All statistical analyzes were performed using the statistical software package R (version 3.4.1) (www.r-project.org). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

The general characteristics of the patients and their tumor samples are shown in Tables 1 and 2. The parity was 2.07 births with a range between 0 and 8 deliveries. The stage (FIGO) was I in seven patients (29.17%) and III/IV in 17 patients in the EOC group (70.83%). The tumor was moderately differentiated (G2) in nine (37.5%) and poorly differentiated in 15 (62.5%) cases.

There was no correlation between the expression levels of the analyzed genes and age, menarche, parity and period after menopause initiation. *TRAP1*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPD1* *HSPB1*. Five genes showed differential expression between tumor samples of the EOC group and samples from the cystadenoma, primary and metastatic EOC samples, *TRAP1*, *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPD1* *HSPB1*, although no significantly differ among the groups ($p\text{-value} > 0.050$) (Figure 1). *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* were significantly under-expressed in the primary and metastatic EOC groups in comparison to the expression profile presented in normal ovarian tissues, with *HSPA1L* showing the lowest expression in both carcinoma groups (Figure 2).

There was no correlation between the seric levels of the CA125 tumor marker and the expression of the HSP genes analyzed.

A comparison between the expression profile of the HSP genes and the OC staging showed that *TRAP1* expression was significantly greater in tumors at stage I and II than in tumors at stages III and IV of EOC patients ($p = 0.040$) (Table 2). Comparing gene expression and the degree of tumor differentiation showed that grade II tumors had significantly higher *HSPB1* expression than grade III tumors ($p\text{-value} = 0.035$) (Table 2).

There was no correlation between cytoreduction or the presence of ascites and the expression of the HSP genes analyzed herein (Table 2).

There were no significant differences ($p = 0.05$) between the expression of the HSP genes evaluated and overall survival (OS) or disease-free survival (DFS) (Figures 3 and 4). However, analyzing gene expression in relation to OS, we observed a significant influence of *HSPA1A* expression levels on the risk of dying of EOC ($p = 0.048$). An

increase of one unit in the gene log decreased the risk of dying by 0.73 times [0.53; 0.99] (Table2).

In silico network protein analysis made on STRING database revealed the protein-protein interactions between the proteins codified by the genes analyzed by us (Figure 5).

4. DISCUSSION

EOC is a very heterogeneous disease and the most lethal gynecological neoplasia [29]. Despite extensive effort, EOC continues to be a poorly understood disease and patients survival rates remain low. Therefore, new strategies for early diagnosis, prognostic markers for clinical assessment and a better understanding of the mechanisms related to ovarian carcinogenesis are of extreme importance in order to obtain better outcomes for the affected patients. In this study, we investigated whether a gene signature among patients with and without EOC could be identified. To this end, we evaluated the level of expression of the genes *TRAP1*, *HSPD1*, *HSPB1*, *HSPA1A*, and *HSPA1L* in tumor samples obtained from patients with cystadenoma, primary and metastatic EOC in relation to baseline expression of these genes in normal ovary (NO) tissues. Therefore, expression of each gene in NO was assigned an arbitrary quantity of "1" and their expression in the tumor samples were expressed in terms of their fold difference to NO [29]. We found that these five genes were differentially expressed between the groups, but the prediction of EOC metastasis with gene expression profiling was not better than chance alone. The comparison between the expression levels of the studied genes in the tumor groups with the NO group showed that *HSPA1A*, *HSPA1L* and *TRAP1* were significantly under-expressed in the EOC groups.

The under-expression of HSP70 isoforms was previously observed in OC [30]. According to these authors, the genes *HSPA1A* and *HSPA1L* reside on a particularly vulnerable CpG island, which is subject to methylation and boosts the immune response. In addition, the copy number variation (CNV) of the HSP genes described for different tumors may also explain the under-expression of the observed *HSPA1A*, *HSPA1L* and

TRAP1 genes in our study. *TRAP1* expression is correlated with the copy number, suggesting this could be one of the driving mechanisms for the loss of *TRAP1* expression in OC [31].

Several gene expression studies identifying molecular markers related to cancer progression have been published . Overall, there is a considerable overlap between previous studies and our study in terms of genes differentially expressed between normal and EOC. As described in the literature, at the molecular levels, EOC is remarkably heterogeneous, a factor that makes EOC a difficult disease to treat effectively [32].

TRAP1, *HSPD1*, *HSPB1*, *HSPA1A*, and *HSPA1L* belong a stress or HSPs family of highly conserved genes that are expressed in response to a wide variety of physiological and environmental insults in order to maintain cellular homeostasis or to contribute to cell survival to lethal conditions. The stresses involving HSPs include such as hypoxia, hyperoxia, exposure to UV light and chemicals, viral agents, nutritional deficiencies (e.g. glucose deprivation), surgical, emotional and mechanical stress, among other stresses [33-36]. Beyond that, biological processes of proteins among HSP associated genes analyzed by the Gene functional and Network pathway analysis performed herein revealed their function in chaperone mediated protein folding.

TRAP1 encodes a mitochondrial chaperone protein that is a member of the heat shock family 90 (HSP90). The protein has ATPase activity and interacts with tumor necrosis factor type I [37]. Interestingly, alternate splicing results in multiple transcript variants [38] and several other studies suggested that TRAP1 have an oncogenic role in a variety of cancer types [39]. In colorectal carcinoma, increased expression of TRAP1 was correlated with increased lymph node involvement, more advanced stages of the disease, and reduction in overall survival. TRAP1 is currently a marker predicting worse outcomes in colorectal cancer [40]. Moreover, low levels of TRAP1 in OC has been related to high tumor grade and more advanced stage and resistance to platinum [41].

In OC clinical samples, *TRAP1* is often deleted in high-grade serous OC patients and it is correlated directly with epithelial-mesenchymal transition, which is an important determinant of the invasive potential of tumor cells [31]. Therefore, TRAP1 downregulation is linked to tumor progression in OC patients. Furthermore, TRAP1 was shown to be associated with a metabolic shift, ultimately causing the onset of resistance to

cisplatin-based chemotherapy in OC cells lines and tissues [42]. Similarly, *TRAP1* was under-expressed in the EOC group compared with the NO group and showed higher expression in tumors at stages I/II than at II/IV ($p=0.040$), a finding that correlates with a positive impact on the response to chemotherapy and survival of patients with OC.

The *HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPD1*, and *HSPB1* genes are expressed either constitutively or regulated inductively. High molecular weight HSPs are ATP-dependent chaperones (*HSPA1A*, *HSPA1L*, *HSPD1*), whereas small HSPs act in an ATP-independent fashion (*HSPB1*). As molecular chaperones, the function of HSPs is to regulate protein folding, transport, translocation and assembly, particularly helping to refold misfolded proteins or assist their elimination [35, 36]. The literature relates the overexpression of these genes as a possible marker of worse prognosis in other tumor types [43]. It is known that in cancer there is a need for ambiguous signal transduction, hence there are greater demand for chaperones. The phenomenon is probably linked to the drastic changes in protein homeostasis caused by the accumulation of mutated proteins in cancer cells [36].

In our study, *HSPA1A* was the gene that presented the lowest level of expression in relation to the NO group. In addition, it showed a significant influence on the overall survival of patients with EOC, who showed a decrease in their risk of death by 0.73 times for every increase in one unit in *HSPA1A* expression, suggesting a protective role for this gene. This result highlights the potential of this gene as a possible genetic marker to assist the clinical evaluation of the prognosis of the disease.

Elstrand and colleagues (1996) showed the association between *HSPB1* expression and high-grade OC primary tumors and metastases [44]. Langdom et al. (1995) found similar results in OC primary tumors and cell lines [45]. The immune response to *HSPB1* is also increased in women with OC and other gynecological tumors and some studies suggested the use of anti-HSP27 antibody concentrations for early diagnosis of relapse or disease progression [46,47]. Several authors showed the association of *HSPB1* with early disease staging and longer survival of patients with OC, with most studies suggesting an association between *HSPB1* overexpression and worse prognosis [48]. There appears to be a co-expression of *HSPB1* or a positive correlation between *HSPB1* expression and resistance to chemotherapy and expression of *MDR1* (gene for resistance to multiple drugs) [49]. Thus, there is evidence that the overexpression and activity of *HSP70* is associated

with increased carcinogenesis, metastatic potential, and resistance to chemotherapy. However, in our series the expression of HSPB1 was not significantly different in the EOC group in comparison to the control group. The positive correlation of HSP70 with grade II of tumor differentiation would contradictorily indicate a better prognosis with increased HSPB1 expression.

The main limitation of this study lies in the small number of patients and controls. This may explain the contrast between our HSPB1 observation and those reported elsewhere and of the absence of significant differences between analyses performed with EOC and NO patients regarding the other genes evaluated. However, our findings add substantially to our understanding of the HSP genes in the ovarian carcinogenesis process. The downregulation of *HSPA1A*, *HSPA1L* e *TRAP1* suggests the idea for these genes enhances the ability of the cancer cells to die to a range of lethal conditions. Further studies with a larger number of patients and longer follow-up are necessary to assess the accuracy of the prognostic impact of these results.

COMPETING INTERESTS

All authors declare: no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

FUNDING

This work was financially supported through grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FIGURE AND TABLES

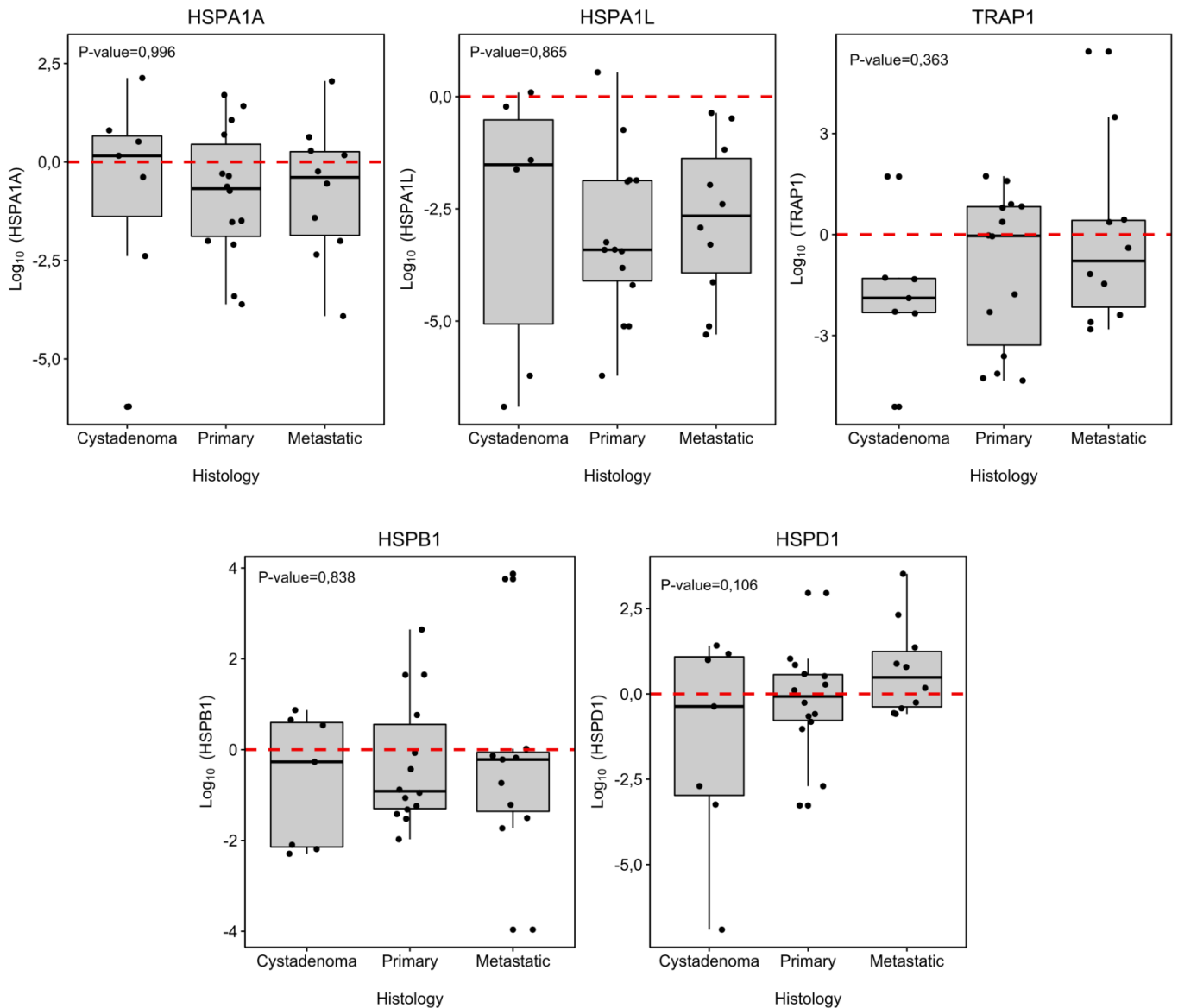


Figure 1: The association of *TRAP1*, *HSPD1*, *HSPB1*, *HSPA1L* and *HSPA1A* expression in ovarian tumors. The values shown represent the *RAP1*, *HSPD1*, *HSPB1*, *HSPA1L* and *HSPA1A* expression levels. The horizontal line indicates the median expression ratio, and the box plots demonstrate the interquartile range (25–75%). The 10th to 90th percentile ranges are also shown. The differences between groups were evaluated using a Mann–Whitney U test and a Wilcoxon test. EOC: epithelial ovarian carcinoma.

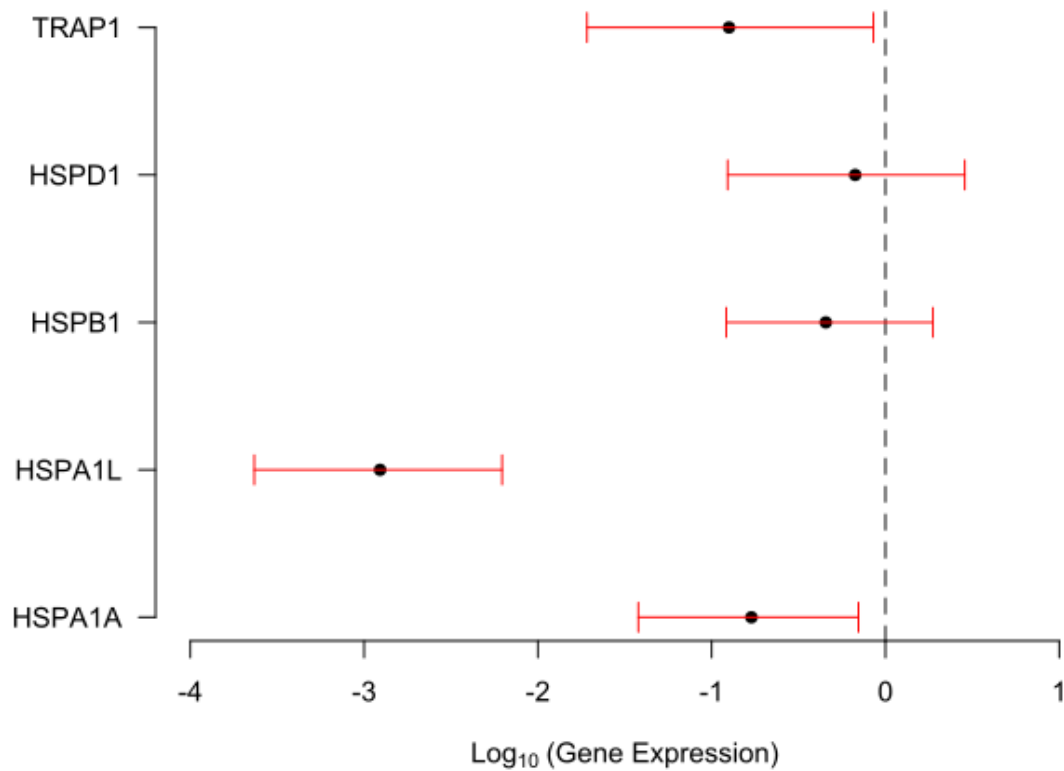


Figure 2: Comparison of the expression of the TRAP1, HSPD1, HSP1, HSPA1 and HSPA1A genes in patients diagnosed with primary and metastatic ovarian epithelial cancer compared to patients with normal ovary. Patients with normal ovary are considered as control (value of the expression equals 1, that is, their logarithm equals 0). The confidence intervals (red stems) of the genes intersecting the dashed line do not differ from each other. Intervals with confidence below the dashed line (less than 0) indicate that the gene is underexpressed.

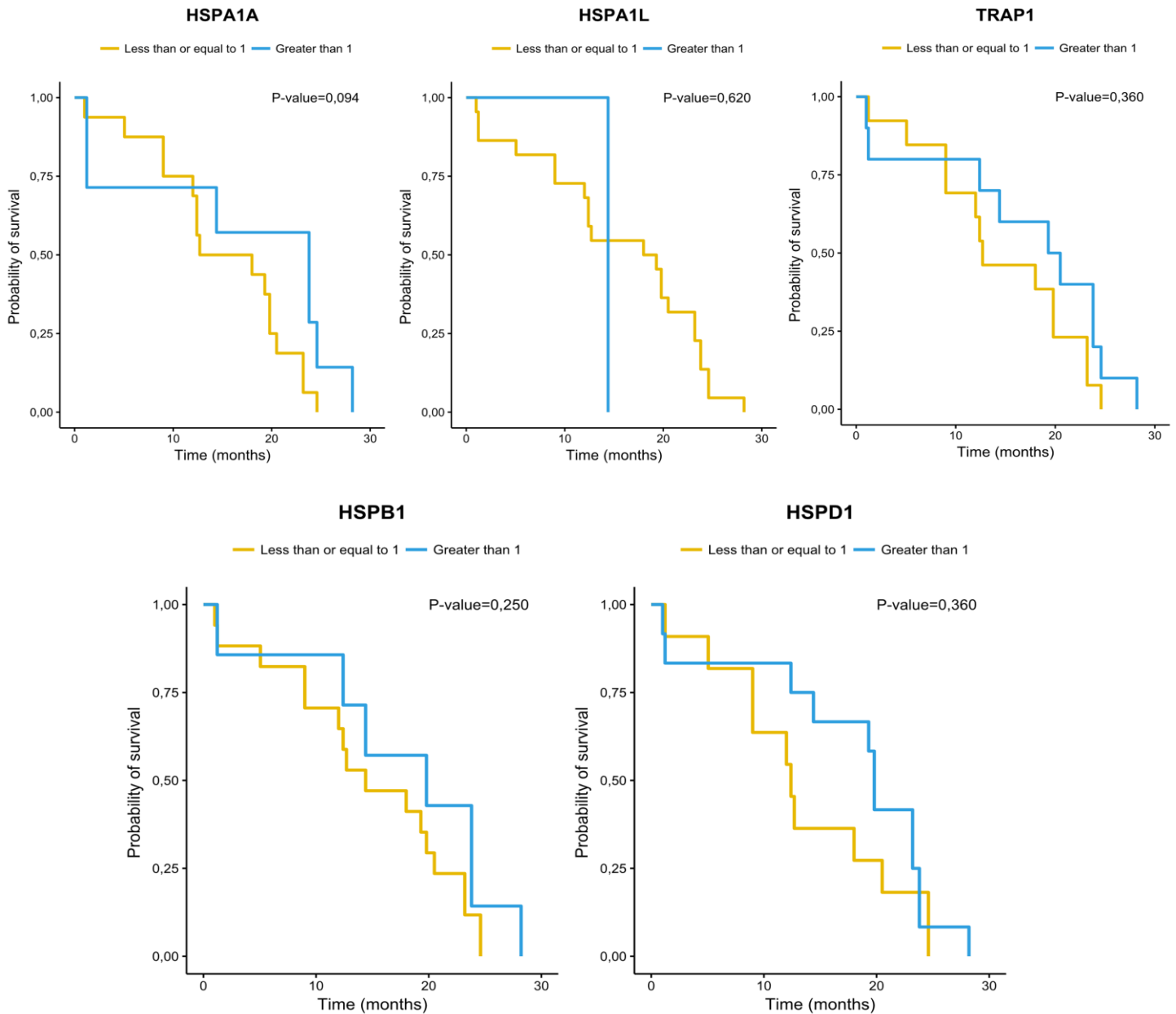


Figure 3: Kaplan-Meier analysis of overall survival among women with primary and metastatic EOC according to their *TRAP1*, *HSPD1*, *HSPB1*, *HSPA1L* and *HSPA1A* gene expression levels. EOC: epithelial ovarian carcinoma.

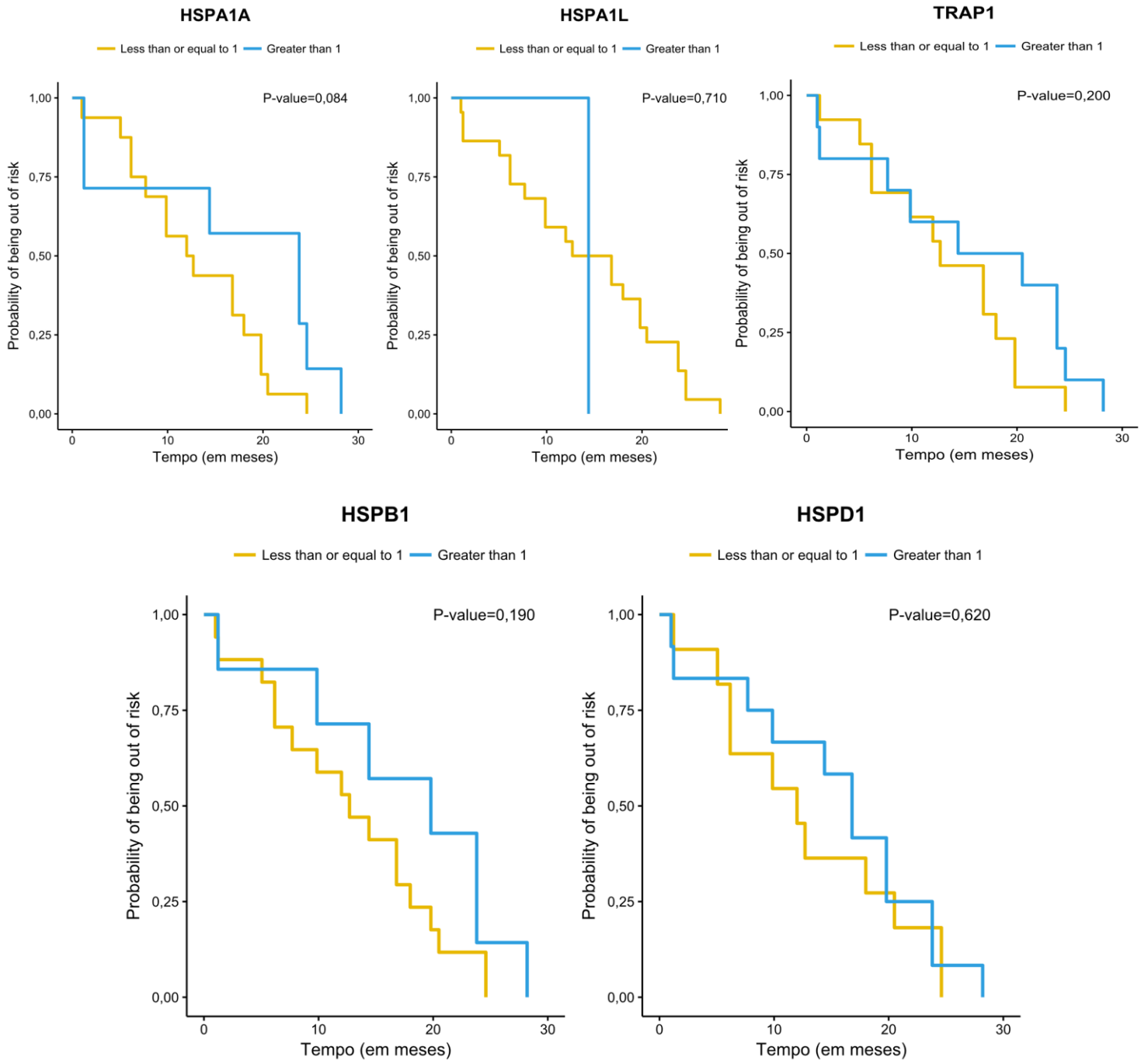


Figure 3: Kaplan-Meier analysis of survival among women with primary and metastatic EOC according to their *TRAP1*, *HSPD1*, *HSPB1*, *HSPA1L* and *HSPA1A* gene expression levels. EOC: epithelial ovarian carcinoma.

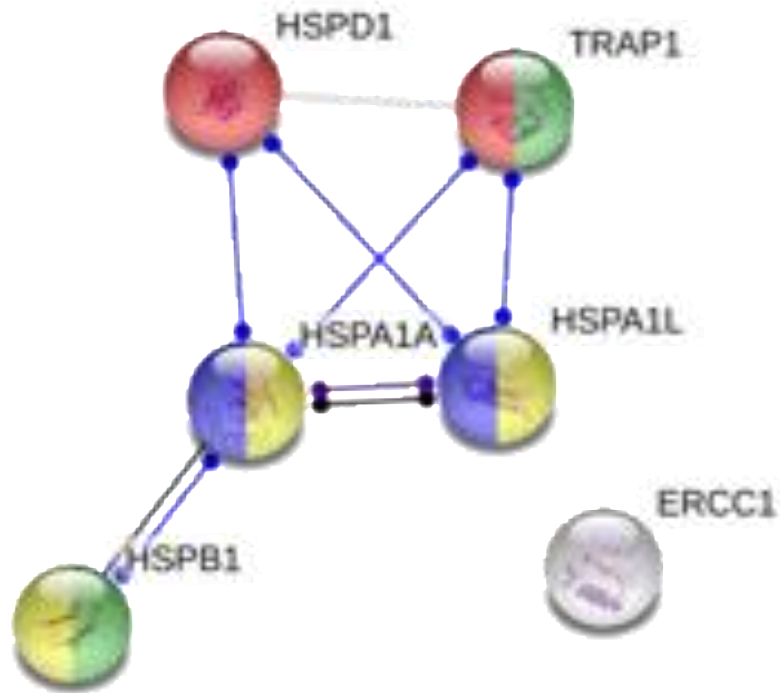


Figure 5 Gene functional and Network pathway analysis of TRAP1, HSPD1, HSPB1, HSPA1L and HSPA1A. The Gene functional and Network pathway analysis evaluated in silico by STRING database. As cores dos círculos indicam as funções das HSP no network: Vermelho -Chaperone mediated protein folding; Verde- negative regulated of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; Amarelo- MAPK signaling pathway e Roxa – Spliceossoma.

Table 1 Clinicopathologic characteristics in ovarian sample.

Variables		Geral	Cistoadenoma	EOC Primáry	EOC Metastatic	Normal ovary	P-value
Estáge	I	7 (29,2%)	0 (0,0%)	5 (35,7%)	2 (20,0%)	-	-
	III	12 (50%)	0 (0,0%)	6 (42,9%)	6 (60,0%)	-	
	IV	5 (20,8%)	0 (0,0%)	3 (21,4%)	2 (20,0%)	-	
Menopause	No	26 (52%)	4 (57,1%)	3 (21,4%)	2 (20,0%)	17 (89,5%)	0,000 ¹
	Yes	24 (48%)	3 (42,9%)	11 (78,6%)	8 (80,0%)	2 (10,5%)	
Ascites	No	14 (50%)	7 (100,0%)	4 (30,8%)	3 (37,5%)	-	-
	Yes	14 (50%)	0 (0,0%)	9 (69,2%)	5 (62,5%)	-	
Tumor differentiation degree	2	9 (37,5%)	0 (0,0%)	5 (35,7%)	4 (40,0%)	-	-
	3	15 (62,5%)	0 (0,0%)	9 (64,3%)	6 (60,0%)	-	
CA 125	CA 125 < 35	8 (25%)	3 (42,9%)	4 (28,6%)	1 (9,10%)	-	-
	CA125 > 35	24 (75%)	4 (57,1%)	10 (71,4%)	10 (90,9%)	-	
Age	Média ± Desvio padrão	53,37 (11,74)	50,00 ± 16,54	57,93 ± 10,54	59,55 ± 10,76	47,68 ± 8,33	0,017 ²
Menarche	Média ± Desvio padrão	12,84 (1,32)	12,57 ± 1,13	12,79 ± 1,37	13,10 ± 1,45	-	-
Parity	Média ± Desvio padrão	2,07 (1,73)	2,14 ± 3,08	2,00 ± 1,24	2,10 ± 1,20	-	-
Time Menopause	Média ± Desvio padrão	8,61 (9,31)	6,86 ± 11,19	8,62 ± 9,03	10,13 ± 9,03	-	-

EOC: epithelial ovarian carcinoma. The values represent the mean ± standard error or n (percentage). The comparison between groups was performed by ¹Teste Exato de Fisher; ²Kruskal-Wallis as indicated. The median serum level of CA-125 was considered to determine the cut-off point. The tumor differentiation degree was classified as moderately differentiated (G2) or poorly differentiated (G3). Cytoreduction was considered optimal for a residual tumor of b 1 cm after tumor resection surgery. The tumor was staged according to the 2009 recommendations of FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics). A p value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

Table 2 Comparison between the clinical characteristics of patients with EOC and the expression of the TRAP1, HSPD1, HSPB1, HSPA1L and HSPA1A genes

Variables	Log₁₀ (HSPA1A)	Log₁₀ (HSPA1L)	Log₁₀ (HSPB1)	Log₁₀ (HSPD1)	Log₁₀ (TRAP1)
Histological Type	0,996	0,865	0,838	0,106	0,363
Age	0,797	0,309	0,723	0,287	0,451
Menarche	0,782	0,713	0,68	0,554	0,351
Parity	0,119	0,061	0,852	0,152	0,594
Time menopause menopausa	0,804	0,643	0,486	0,632	0,409
CA125	0,222	0,806	0,539	0,842	0,315
Estage	0,962	0,327	0,075	0,193	0,040
Menopause	0,927	0,664	0,786	0,600	0,492
Ascite	0,562	0,573	0,585	0,174	0,798
Tumor diffrentiation degree	0,397	0,305	0,035	0,080	0,163
Cytoreduction	0,797	0,772	0,239	0,824	0,422
Risk of death (P (P value)	0,73 (0,048)	1,09 (0,491)	0,92 (0,527)	1,02 (0,892)	0,94 (0,511)

REFERENCES

1. *Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013[2016-09-09] <http://globocan.iarc.fr>.
 2. *Siegel RL, Miller KD and Jemal A.* Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.
 3. *Linasmita V, Pattaraarchachai J, Daengdeelert P.* Prognostic factors for survival of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004;85(1):66-69.
 4. *Corrado G, Salutari V, Palluzzi E, Distefano MG, Scambia G, Ferrandina G.* Optimizing treatment in recurrent epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017,17(12):1147-1158.
 5. *Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, et al.* Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9:389-93.
 6. *du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, et al.* A Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1320-30.
 7. *Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, et al.* Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9:389-93.
-

8. *Agarwal R, Kaye SB.* Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? *Ann Oncol* 2005;16(1):4-6.
 9. *Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S.* Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38(3):226-256.
 10. *Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK.* Heat shock proteins and heatshock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch.Toxicol.* 2013; 87 (1), 19–48.
 11. *Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14 (1):105–111.
 12. *Fujiwara K, Shirafuji H, Fushitani K, Fujimoto K, Kohno I, Modest EJ.* Change in the localization of heat shock protein 27 (HSP 27) in BG-1 human ovarian cancer cells following treatment by the ether lipid ET-18-OCH3. *Anticancer Res.* 1999;19 (1A), 181–187.
 13. *Kamishima T, Fukuda, T, Yoshiya N, Suzuki T.* Expression and intracellular localization of heat shock proteins in multidrug resistance of a cisplatin resistant human ovarian cancer cell line. *Cancer Lett.* 1997;116 (2), 205–211.
 14. *Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y.* Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett.* 2001;168 (2), 173–181.
 15. *Hu W, Wu W, Yeung SJ, Freedman RS, Kavanagh JJ, Verschraegen CF.* Increased expression of heat shock protein 70 in adherent ovarian cancer and mesothelioma following treatment with manumycin, a farnesyl transferase inhibitor. *Anticancer Res.* 2002; 22 (2A), 665–672.
-

16. *Liu RL, Opipari AW, Tan L, et al.* Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer Res* 2002;62:924-931
 17. *Song TF, Zhang ZF, Liu L, Yang T, Jiang J, Li P.* Small interfering RNA-mediated silencing of heat shock protein 27 (HSP27) increases chemosensitivity to paclitaxel by increasing production of reactive oxygen species in human ovarian cancer cells (HO8910). *J. Int. Med. Res.* 2009; 37 (5), 1375–1388.
 18. *Landriscina, M, Amoroso MR, Piscazzi A, Esposito F.* Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. *Gynecol. Oncol.* 2010;117 (2), 177–182.
 19. *Elstrand MB, Stavnes HT, Trope CG, Davidson, B.* Heat shock protein 90 is a putative therapeutic target in patients with recurrent advanced-stage ovarian carcinoma with serous effusions. *Hum. Pathol.* 2012; 43 (4), 529–535.
 20. *Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, De Vries EG, Kampinga HH, Van der Zee AG.* Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int J Cancer* 1999;84(3):234-8.
 21. *Zhao M, Ding JX, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin YX, et al.* Heat shockprotein 27: a potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer? *Tumour Biol.* 2014; 35 (2), 1051–1056.
 22. FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics. Clinical practice guidelines; 2009.
 23. *Livak K, Schmittgenb TS.* Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; 25(4):402-408.
-

24. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43: Database issue D447–D452
 25. Montgomery DC, Peck EA, Vining GG. Introduction to linear regression analysis (Vol. 821). John Wiley & Sons, 2012.
 26. Myles H, Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons, 1999.
 27. Colosimo EA, Giolo SR. Análise de sobrevivência aplicada. In: ABE-Projeto Fisher. Edgard Blücher, 2006.
 28. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Assn.* 1958; 53 (282): 457–481.
 29. Kurman, RJ, Shin, LM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer – a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34 (3): 433-43.
 30. Singh MK, Sharma B, Tiwari PK. The small heat shock protein Hsp27: Present understanding and future prospects. *Journal of Thermal Biology.* 2017 Jun 7; 69:149-154
 31. Amoroso MR, Matassa DS, Agliarulo I, Avolio R, Lu H, Sisinni L, Lettini G, Gabra H, Landriscina M, Esposito F. TRAP1 downregulation in human ovarian cancer enhances invasion and epithelial-mesenchymal transition. *Official Journal of the Death Differentiation Association.* Citation: *Cell Death and Disease* 2016 7, e2522; doi: 10.1038/cddis.2016.400
 32. Pfister K, Radons Jürgen, Busch R, et al. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype. *Cancer.* 2007 Aug 15;110(4):926-35.
-

33. Ref 51 beere ,H.M (2001) stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins
 34. *Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, and Smith C.* Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta* 2011; 1816: 89-104.
 35. *Wang X, Chen M, Zhou J, Zhan Xu.* HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review). *International Journal of Oncology* 2014; 45: 18-30.
 36. *Arrigo A, Gibert B.* HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers* 2014; 6: 333-365.
 37. *Matassa DS, Amoroso MR, Maddalena F, Landriscina M, Esposito F.* New insights into TRAP1 pathway. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 235–248
 38. *Costantino E, Maddalena F, Calise S, Piscazzi A, Tirino V, Fersini A, Ambrosi A, Neri V, Esposito F, Landriscina M.* TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009;279:39-46.
 39. *Aust S, Bachmayr-Heyda A, Pateisky P, Tong D, Darb-Esfahani S, Denkert C, Chekerov R, Sehouli J, Mahner S, Gorp TV, Vergote I, Speiser P, Horvat R, Zeillinger R, Pils D.* Role of TRAP1 and estrogen receptor alpha in patients with ovarian cancer – A study of the OVCAD consortium.. *Molecular Cancer.* 2012; 11:69 doi:10.1186/1476-4598-11-69
 40. *Han JJ, Baek SK, Lee JJ, Kim GY, Kim Sy, Lee SH.* Combination of TRAP1 and ERCC1 Expression Predicts Clinical Outcomes in Metastatic Colorectal Cancer Treated with Oxaliplatin/5-Fluorouracil. *Cancer Res Treat.* 2014 jan; 46(1):55-64 doi: 10.4143/crt.2014.46.1.55
-

41. *Cappello F, Di Stefano A, David S, Rappa F, Anzalone R, La Rocca G, D'Anna SE, Magno F, Donner CF, Balbi B, Zummo G.* Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Cancer Society.* 2006 Nov 15; 107:2417-2424 doi:10.1002/cncr.22265
 42. *Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, Avolio R, Arzeni D, Procaccini C et al.* Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer. *Cell Death Differ* 2016; 23: 1542–1554.
 43. *Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A.* Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2012; 5:1-7
 44. *Elstrand MB, Kleinberg L, Kohn EC, Trope CG, Davidson B.* Expression and clinical role of antiapoptotic proteins of the bag, heat shock, and Bcl-2 families in effusions, primary tumors, and solid metastases in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:54-62.
 45. *Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, et al.* Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:1603-9.
 46. *Olejek A, Damasiewicz-Bodzek A, Bodzek P, Wielkoszyński T, Zamłyński J, Stoltny P, Skutil M.* Concentrations of antibodies against heat shock protein 27 in the sera of women with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(9):1516-20.
 47. *Korneeva I, Bongiovanni AM, Girotra M, Caputo TA, Witkin SS.* Serum antibodies to the 27-kd heat shock protein in women with gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:18-21
-

48. *Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, Geisler HE, Miller GA, Zhou Z, Wiemann MC.* HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004;25(2): 165-8.

49. *Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Marx D, Meden H.* Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. *Anticancer Res* 1998;18:1967-71.

7. Considerações Finais

Este estudo é uma pesquisa promissora e original que, através do conhecimento da expressão dos genes *TRAP1*(*HSP70*), *HSPB1* (*HSP27*) , *HSPA1A* e *HSPA1L* (*HSP70*) e *HSPD1* (*HSP60*) no CEO evidenciou achados que corroboram com dados já existentes na literatura e também sinalizou a relação da subexpressão dos genes *HSPA1A*, *HSPA1L* e *TRAP1* como um possível marcador prognóstico e estudos para validação e melhor entendimento das vias envolvidas deverão ser elaborados.

8. Anexos

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Resolução 466/2012

Título do estudo: Análise da expressão dos genes TRAP1, HSPB1, HSPD1, HSPA1L e HSPA1A em amostras de Câncer epitelial de ovário: Implicações no prognóstico e na resistência a quimioterapia baseada em platina

Proposta

Ao assinar este documento você concorda em participar como paciente no estudo citado acima. Um estudo clínico é uma pesquisa com seres humanos, através da qual se tenta comprovar algum tratamento ou novo exame que possa melhorar a vida dos pacientes. Este estudo é aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Vera Cruz. Todos os procedimentos serão realizados com o maior rigor técnico e com o compromisso de não prejudicá-lo. Todos os seus exames bem como seu prontuário médico serão mantidos confidenciais e você não será identificado de maneira escrita ou verbal em nenhum trabalho, documento ou fotografia.

Você concorda em ler todo este termo e ouvir todas as explicações sobre o estudo clínico. Caso você não saiba ler, todas as informações serão lidas e explicadas oralmente para você.

Você concorda que fez todas as perguntas que julgou necessário para esclarecer suas dúvidas e recebeu respostas para todas, não existindo questões pendentes.

Você receberá uma cópia deste formulário independente do consentimento para participar deste estudo.

Natureza e Objetivos do Estudo

Você foi convidada a participar deste estudo porque é portadora de um tumor em seu ovário, e realizará cirurgia para retirada deste tumor.

O seu médico pode ter informado a você que se trata de um tumor maligno ou que ainda não sabe a natureza do processo, ou seja, se o tumor é de natureza benigna ou maligna). Você pode ter sido informada também que o motivo da cirurgia é uma massa em região da pelve ou que há nódulos ou massas intra-abdominais que precisam ser avaliadas quanto à sua natureza.

Os objetivos e os procedimentos que serão realizados durante a cirurgia não sofrerão qualquer alteração em decorrência desta pesquisa.

Não existe, até o momento, um único teste ou procedimento que contenha todas as informações sobre como será a evolução das pacientes com este tumor: quanto tempo de sobrevida, qual a chance de acontecer uma recaída e quando ela vai ocorrer, se a paciente vai responder bem ou mal à quimioterapia proposta.

O propósito deste estudo é observar se há diferenças nos resultados dos exames genéticos feitos nas pacientes que tem tumores benignos e malignos. E, uma vez que exista esta diferença, queremos saber se podemos usar estas diferenças genéticas para tentar responder a questões sobre resistência ao tratamento e sobre tempo para a doença reaparecer. Seu tratamento e acompanhamento clínico continuarão sendo realizados por seu médico de origem, e nada será modificado em sua rotina, com a exceção do que está sendo informado neste documento.

Descrição dos Procedimentos

Ao assinar este termo, você concorda que o pesquisador revise seu Prontuário Médico com objetivo de preenchimento de Ficha Clínica onde constarão dados relacionados a sua história médica anterior da cirurgia e também autoriza o pesquisador a continuar acompanhando o seu prontuário após a cirurgia.

Além disso, concorda em disponibilizar uma amostra do material (ou tumor) que será retirado para análise durante a cirurgia. Estas amostras não comprometerão a quantidade de material necessária para o laboratório de anatomia patológica avaliar a natureza da seu problema, após a cirurgia.

Não será realizada mais nenhuma coleta de material além desta amostra coletada durante a cirurgia.

Suas informações serão registradas em uma ficha clínica, na qual não constará seu nome ou qualquer dado que permita identificá-la.

Você poderá ser contatada para esclarecer algum dado sobre sua história clínica (dados que não estejam muito claros em seu prontuário).

Riscos e desconfortos potenciais para você

Pelo fato deste ser um estudo que não modifica de nenhuma maneira seu tratamento ou acompanhamento clínico, os riscos e desconfortos para você seriam os relacionados à própria cirurgia, que já foi indicada pelo cirurgião responsável pelo seu caso e não tem qualquer relação com a existência desta pesquisa.

Benefícios

Se participar deste estudo, não haverá benefícios diretos para você, pois não podemos alterar qualquer decisão de seu tratamento baseados nos resultados dos testes genéticos, já que se tratam de dados preliminares.

Você não receberá nenhum pagamento devido à sua participação no estudo. Você não terá qualquer despesa pessoal durante sua permanência no estudo, incluindo exames e consultas.

Ao final do estudo, você e seu médico serão informados dos resultados dos testes, bem como quaisquer problemas ou limitações ocorridas.

Desistência

Você não é obrigada a participar deste estudo. Caso decida não participar, o seu tratamento e acompanhamento clínico atual e futuro não será prejudicado de nenhuma maneira. Você não será penalizada por não participar deste estudo.

Mesmo que você decida participar deste estudo, poderá a qualquer momento desistir e cancelar seu termo de consentimento informado, não necessitando para tal dar qualquer justificativa. Esta decisão não afetará você, seus registros médicos ou sua relação com os médicos ou instituições envolvidos.

Retirada do Estudo

O investigador poderá por sua vez excluí-la do estudo a qualquer momento desde que julgue que a senhora não poderá oferecer a cooperação necessária aos procedimentos do estudo, ou se julgar que sua participação possa de alguma forma lhe trazer riscos ou desconfortos.

Uso de amostra biológica (tecido tumoral)

Amostras da massa tumoral, que será retirada durante a cirurgia, serão coletadas com a única finalidade de realização de estudos genéticos relacionados ao estudo.

Os pesquisadores somente armazenarão amostras não utilizadas, caso seja do seu consentimento e para que isso aconteça você deverá autorizar, também neste termo, este outro procedimento.

Declaração de participação

Você atesta ter lido todo o texto acima em todas as 3 páginas, ter recebido respostas para todas as suas dúvidas, e de livre e espontânea vontade concorda em participar neste estudo clínico.

Em caso de dúvidas, poderá contatar os pesquisadores responsáveis ou o COEP da UFMG nos telefones e endereços abaixo:

Dr. Warne Pedro de Andrade

Av. Barbacena 640 Bairro : Barro Preto - Belo Horizonte - MG

CEP: 301190130 Tel: (31) 3290-1250 Tel Celular: (31) 91940613

Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Av. Alfredo Balena, 190, Sta Efigênia – Belo Horizonte-MG

CEP 30130-100 Tel: 3409-9764

Comitê de Ética em Pesquisa do hospital Vera Cruz Belo Horizonte – MG

Assinatura do participante

Data

Assinatura do pesquisador

Data

Testemunha 1

Data

Autorizo armazenamento de amostras de tecido tumoral que não forem utilizadas para análise, para que possam ser utilizadas em estudos futuros.

Assinatura do participante

Data

ANEXO II – CONTEÚDO DA FICHA CLÍNICA PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS

1.Número do Prontuário:

2.Instituição:

3.Iniciais do Paciente:

4.Data de Nascimento:

5.Cirurgia:

5.1.Data:

5.2.Descrição do procedimento:

5.3.Citorredução (ótima, subótima, não se aplica)

5.4.Natureza da amostra tecidual (tecido ovariano, metástase)

6.Laudo Anátomo-Patológico:

6.1.Natureza da lesão (tumor benigno, tumor maligno, tecido ovariano normal)

6.2.Tipo histológico (adenoma, adenocarcinoma)

6.3.Subtipo histológico

6.4.Grau histológico

7.Estadiamento patológico (FIGO):

T:

N:

M:

Estadio Patológico:

No caso de metástase à distância, definir o sítio:

8. Quimioterapia Finalidade (adjuvante, paliativa, não se aplica)

8.1. Esquema empregado (planejamento terapêutico):

8.2. Data de início:

8.3. Data de término:

8.4. Número de ciclos realizados:

8.5. Interrupção de tratamento (toxicidade ou outro – se outro motivo, especificar)

8.6. Necessidade de redução de dose (em caso afirmativo, justificar)

9. Resposta à quimioterapia (no caso de citorredução subótima ou doença metastática)

10. Recaída (sim, não, não se aplica)

10.1. Sítio de recaída:

10.2. Data da recaída:

10.3. Quimioterapia (sim, não)

10.4. Esquema de quimioterapia (planejamento terapêutico, data de início, término, número de ciclos realizados, interrupção de tratamento, necessidade de redução de dose)

10.5. Resposta à quimioterapia:

Belo Horizonte, ____/____/____
