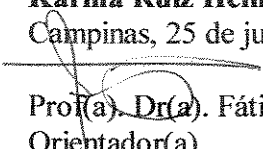


JULIANA KARINA RUIZ HEINRICH

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Juliana Karina Ruiz Heinrich.**

Campinas, 25 de julho de 2005.


Prof(a). Dr(a). Fátima Aparecida Böttcher Luiz.
Orientador(a)

**PADRÕES DE PERDAS E GANHOS GENÔMICOS
ASSOCIADOS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À
QUIMIOTERAPIA À BASE DE PLATINA EM PACIENTES
PORTADORAS DE CARCINOMA DE OVÁRIO.**

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

CAMPINAS

2005

JULIANA KARINA RUIZ HEINRICH

**PADRÕES DE PERDAS E GANHOS GENÔMICOS
ASSOCIADOS AO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À
QUIMIOTERAPIA À BASE DE PLATINA EM PACIENTES
PORTADORAS DE CARCINOMA DE OVÁRIO.**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração
em Genética Médica*

ORIENTADORA: Profa.Dra.Fátima Böttcher Luiz

CAMPINAS

2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	T/UNICAMP
	H364p
V	8
TOMBO BCI	66307
PROC.	16-86-03
C	☐
D	☒
PREÇO	4,00
DATA	9/10/05
Vº CPD	

3113 ID: 393389

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

H364p

Heinrich, Juliana Karina Ruiz

Padrões de perdas e ganhos genômicos associados ao fenótipo de resistência à quimioterapia à base de platina em pacientes portadoras de carcinoma de ovário. / Juliana Karina Ruiz Heinrich. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Fátima Böttcher Luiz

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ovário - câncer. 2. Hibridização. 3. Quimioterapia. 4. Platina. 5. Neoplasias ovarianas. 6. Neoplasias. I. Luiz, Fátima Böttcher. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Sln/fcm)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz

Membros:

1. Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

2. Profa. Dra. Ana Elisabete Silva

3. Prof. Dr. César Cabello dos Santos

4. Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain

5. Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher-Luiz

Curso de Pós Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Genética Médica
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 25/07/2005

200525091

DEDICATÓRIA

Às pequenas

Ana Keunecke Pimenta

e

Nicole Sousa Heinrich,

pelo intenso desejo de suas chegadas

e pela delícia quase contemplativa de vê-las crescendo.

Um saudoso pensamento
de afeto e admiração,
em memória da
Prof. Dra. Kazue Panetta.

À Prof. Dra. Fátima Böttcher Luiz, minha orientadora, no ano em que comemoramos nossas “Bodas de Estanho”, 10 anos de “casamento acadêmico”. Pela amizade e respeito que “apontaram o norte” em nossos encontros e desencontros e pela liberdade de pensamento e ação com que sempre me presenteou. Foram essenciais para minha formação como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira, pela solicitação do auxílio-pesquisa a FAPESP, que possibilitou este estudo.

Aos Profs. Drs. Silvia Toledo, Sérgio Capella, Irene Chagas, Valmir Pessoa e Ann Fox, pela interlocução valiosa e assertiva quando fui apresentada à CGH e nos detalhes técnicos das hibridizações. Meu “porto-seguro” fora de Campinas.

À Prof. Dra. Liliana Lucci de Ângelo Andrade, pela estrutura para a coleta dos tumores e disponibilidade perene em esclarecer minhas dúvidas.

Aos Profs. Drs. César Cabello dos Santos, Denise Cavalcanti e Sophie Derchain, meus examinadores na qualificação, pelo rico debate e por serem muito bons no que fazem.

Aos Profs. Drs. Alfredo Ribeiro-Silva, Ana Elizabete Silva, César Cabello dos Santos, Christine Hackel, Gilberto Schwartzmann, José Vassalo, Juan Clinton Llerena Júnior, Laura Sterian Ward, Sophie Derchain, pelo pronto aceite ao convite para a banca examinadora da tese e por serem profissionais de referência onde estão inseridos, pelo Brasil afora.

À Profa.Dra. Christine Hackel, por disponibilizar tempo, espaço e pessoal para o início das extrações de DNA e pelo carinho com minhas dúvidas acadêmicas e existenciais.

À Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia, a quem eu muito admiro e estimo, que não contribuiu diretamente para a realização deste projeto, mas que ao longo dos anos transformou-se em conselheira.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, pelas oportunidades que tivemos de debater projetos e conceitos.

Aos Profs. Drs. Ilza Maria Urbano Monteiro, Maria Salete da Costa Gurgel, José Antônio Simões, Gustavo de Souza, pelas idéias que trocamos em algum ponto do caminho e que contribuíram para a minha formação.

À Comunidade do CAISM, na pessoa da **Profa. Dra. Mary Ângela Parpinelli**, por acolher esta pesquisa e o laboratório em que trabalho.

Ao pessoal dos laboratórios - fora da Unicamp - Indhira, Taís, Fábio, Renato, Mário Sérgio, Jaque, Bellini, Andréia, Ricardinho e Thomas, por me receberem em seus locais de trabalho com respeito e “solidariedade” de bancada !!!

Ao pessoal do laboratório de Citogenética, no CAISM: Bruno, Carol, Cíntia, Alex e à duas pessoas que passaram por ele, Vera e Danielle, pelo suporte técnico, conversas, risadas e apoio no dia-a-dia.

À bióloga Cássia de Lourdes Campanhol, pela ajuda nas extrações de DNA e por dedicar-se com zelo às suas tarefas no laboratório – o que foi essencial para que eu pudesse “*ir e vir*” e me dedicasse aos experimentos do projeto.

À Vanessa Cristina de Oliveira Franco e à Raquel Mary Rodrigues, biólogas qualificadas, a quem eu tive e ainda tenho o privilégio de orientar em seus projetos, pela dedicação nos tempos adversos e de poucas verbas e porque, apesar disso, elas persistem !

Aos “vizinhos” de laboratório - Bete, Denise, Lúcia, Keila, Priscila, Eliane, Sr. Hamilton, Alexandre, Dra. Rozany, Dra. Tereza e Dr. Fernando - pela convivência tranqüila – apesar de sempre estarmos ocupados em nossos afazeres !

Às secretárias que já me acudiram em meio a tantos papéis, especialmente à **Lucilene (LCE/CAISM)**, **Cláudia (Genética Médica/FCM)**, **Márcia (SCPG/FCM)**, **Margareth (Pós/Toco)**, **Márcia (Toco/FCM)**.

Ao pessoal da Medicina Fetal do CAISM, na pessoa do **Prof. Dr. Ricardo Barini**, somado a tantos outros doutores que estimo: **Maria Otilia Bianchi**, **Luís Violin**, **Suzana Moraes**, **Isabella Machado**, **Kleber Cursino Andrade**, **Cyanna Ravetti**, **Lourenço Sbragia**, pelo estímulo ao pensamento e pela competência que imprimem ao trabalho que compartilhamos.

Aos meus amigos queridos, de perto e de longe, sem exceção, mas especialmente lembrando alguns que nos últimos 4 anos viveram mais de perto meu cansaço e perdoaram minhas ausências: **Josani e Marcelo**, **Rosana e Henrique**, **Silvia e Carlos**, **Lia e Marco**, **Nicki e Chris**, **Ângela e Chico**, **Gabi**, **Priscilla**, **Fábio**, **Alex**, **Dedéia**, **Jan**, **Janice**, **Steve**, **Ron**, **Aaron**, **Ekaterina**, **Sharon**, **Robin**, **P. Rubens** e **Carin**, **Sandra e Werner**, **Nelsinho** e todos os meus queridos coralistas. Essas pessoas são fatores epigenéticos importantes para o meu fenótipo constante de felicidade !

“and last but not least”...

Ao meu querido irmão mais “experiente” Ralph e à sua esposa Sylvia, pelo cuidado e amor sempre presentes e pela referência cristã que são. Um especial obrigada à Sylvia pela revisão ortográfica em menos de 24 horas !

À minha irmã “mais experiente” Bell (a minha Dadá !), carinhosa, batalhadora incansável e que vence um dia após o outro de uma forma linda.

Ao meu querido irmão Beto e à sua esposa Céu, agora morando “além-mar”, de quem tenho muitas saudades, pelo exemplo de coragem em recomeçar quando o coração deseja muito alguma coisa.

Meus sobrinhos – *mulheres feitas e homens barbados* – Maria Helena, Amanda, Papai William, Mitzy, Sara, Wagner, Bia, Erick, Alex e ainda à Mamãe Ju e ao Marcos, sobrinhos que vieram pelo coração.

À minha irmã Eury que, estando mais perto, é onde sempre bate primeiro minha raiva e o meu contentamento, pelo companheirismo e por quase sempre entender o termômetro do meu geninho difícil ! Sem palavras...

Aos meus pais Egon e Isabel, pais corretos, batalhadores, amáveis, admiráveis e que nunca me deram uma palmada. Além da óbvia herança mendeliana, seus exemplos de amor construíram o melhor do meu caráter.

Ao Deus que eu creio e amo, que conhece o meu melhor e o meu pior e, ainda assim, presenteia-me com novas misericórdias a cada manhã.

**“A paciência é o tapete vermelho
sobre o qual chega,
até nós,
a graça de Deus.”**
Max Lucado

Esta tese está sendo apresentada no formato alternativo de disponibilização de dissertações de mestrado e teses de doutorado na UNICAMP e de acordo com o disposto em “*Normas, procedimentos e orientações para publicação de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas*” (2004).

Inclui uma introdução ao tema, os objetivos do projeto de pesquisa, um artigo original submetido à revista *Gynecologic Oncology* – com a descrição dos métodos e resultados obtidos – e, por fim, uma discussão geral e as conclusões. No apêndice, foram incluídas ilustrações, protocolos e os dados das pacientes, que não foram incluídos no artigo, mas poderão auxiliar no melhor entendimento desse trabalho.

As etapas e experimentos necessários ao desenvolvimento desta pesquisa foram realizados nos seguintes locais:

- Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular – CAISM / UNICAMP – Campinas, SP.
- Laboratório de Genética Humana – CBMEG / UNICAMP – Campinas, SP.
- Laboratório de Genética Molecular – Oncologia / USP – São Paulo, SP.
- Laboratório de Genética – GRAACC / UNIFESP – São Paulo, SP.

FINANCIAMENTO

Esse projeto de pesquisa foi financiado com recursos da FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo processo 01/14067-2, conferido ao Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira, do Departamento de Tocoginecologia, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
INTRODUÇÃO.....	22
1. O câncer de ovário.....	23
2. A quimioterapia baseada nos derivados da platina.....	25
3. O fenótipo de resistência aos derivados da platina.....	29
4. A citogenética molecular na detecção da instabilidade genômica.....	33
OBJETIVOS.....	39
ARTIGO ORIGINAL.....	41
<i>Amplification patterns of 1q21-q22 and 17q12-q22 as potential targets for platin resistance in ovarian cancer.....</i>	42
DISCUSSÃO GERAL.....	60
CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APENDICES.....	81
Dados das Pacientes.....	82
Protocolos.....	84
Figuras.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH	CGH baseada em <i>arrays</i>
<i>AKT2</i>	gene, localizado no cromossomo 19 (<i>phosphoinositide-dependant serine-threonine protein kinase</i>)
atm	proteína (<i>ataxia telangiectasia mutated protein</i>)
ATP	adenosina trifosfato
atr	proteína (<i>atm and rad3 related protein</i>)
BACs	cromossomos artificiais de bactéria, vetores de clonagem (bacterial artificial chromosomes)
<i>BAX</i>	gene, localizado no cromossomo 19q (<i>BCL2-associated X protein</i>)
bcrp	proteína (<i>breast cancer resistance protein</i>)
<i>BCL2</i>	gene, localizado no cromossomo 18 (<i>B-cell leukemia 2</i>)
<i>BRCA1</i>	gene, localizado no cromossomo 17 (<i>breast cancer 1</i>)
<i>BRCA2</i>	gene, localizado no cromossomo 13 (<i>breast cancer 2</i>)
ca125	proteína (<i>cancer antigen 125</i>)
CGH	hibridização genômica comparativa (<i>comparative genomic hybridization</i>)
<i>C-MYC</i>	gene, localizado no cromossomo 8 (<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>)
Ddh	proteína (<i>dihydrodiol dehydrogenase</i>)
DNA	ácido desoxiribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
eIF-5A2	proteína (<i>eukariotic initiation factor 5A2</i>)
<i>ERBB-2</i>	gene, localizado no cromossomo 17 (<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> , o mesmo que HER-2/neu)

FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São PauloFDA – Food and Drug Administration
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, também indica o sistema de estadiamento para o câncer de ovário
FISH	hibridização in situ por fluorescência (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
gadd45a	proteína (<i>growth arrest and DNA damage inducible protein</i>)
glp-P	proteína (glicoproteína P)
GSH	sistema glutationa
gst	enzima (glutathione S-transferase)
<i>HER-2/neu</i>	o mesmo que ERBB-2
LMC	leucemia mielóide crônica
LMP	tumor de baixo potencial maligno ou <i>bordeline</i> (<i>low malignant potential ovarian tumors</i>)
mapk	proteína (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
mCGH	CGH baseada em metáfases
MDR	resistência à múltiplas drogas (<i>multi drug resistance</i>)
<i>MDR1</i>	gene, localizado no cromossomo 7 (<i>multi drug resistance</i>)
mrp	proteína (<i>multi drug resistance associated protein</i>)
muc1	proteína (<i>mucin I</i>)
NER	complexo NER (<i>nucleotide excision repair</i>)
<i>N-MYC</i>	gene, localizado no cromossomo 2 (<i>myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived</i>)
p21	proteína p21
p53	proteína p53
pcna	proteína (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)

PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>PIK3CA</i>	gene, localizado no cromossomo 3 (<i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>)
<i>PS6K</i>	gene, localizado no cromossomo 17 (<i>serine threonine kinase</i>)
rad3	proteína, produto do gene ATR
SKY	cariótipo espectral (<i>spectral karyotyping</i>)
<i>TP53</i>	gene, localizado no cromossomo 17 (<i>tumor protein 53</i>)
ULS	sistema de marcação por fluorescência (<i>universal linkage system</i>)
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
xist	transcrito do cromossomo X (<i>X inactivation specific transcript</i>)
<i>ZNF147</i>	gene, localizado no cromossomo 17 (<i>zinc finger protein 147</i>)

	PÁG.
Tabela 1- Vias moleculares envolvidas na diferenciação celular em tipos histológicos distintos de carcinoma de ovário.....	24
Figura 1- Visão geral das vias metabólicas envolvidas na interação dos derivados da platina na célula.....	28
Tabela 2- Alterações cromossômicas em 47 carcinomas de ovário.....	35
Tabela 3- Ganhos e perdas em 20 carcinomas serosos primários e recorrentes.....	36
Tabela 4- Alterações cromossômicas em 19 tumores familiares e 27 esporádicos...	36
Tabela 5- Alterações cromossômicas em 28 carcinomas de ovário (tumores resistentes e sensíveis à cisplatina).....	37
Tabela 6- SKY (cariótipo espectral em 7 adenocarcinomas serosos).....	37
Table 1- Summary of patient information and CGH findings.....	55
Graphic 1- Patients (X) and chromosomal distribution (Y) of abnormalities.....	56
Figure 1- Diagram of amplification patterns for chromosome 17.....	57
Figure 2- Diagram of amplification patterns for 1q.....	58

RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de investigar a participação de regiões cromossômicas específicas para a aquisição do fenótipo de resistência aos quimioterápicos à base de platina, em pacientes com carcinoma de ovário. Amostras de tumor *a fresco* foram investigadas pela técnica de CGH (*comparative genomic hybridization*), para a determinação de perdas e ganhos genômicos em regiões cromossômicas. De um total de 24 pacientes, 16 mostraram-se refratárias ao tratamento quimioterápico e 8 mostraram-se sensíveis. Os dados clínicos e padrões cromossômicos foram comparados. As pacientes com maior número de alterações apresentaram o fenótipo de resistência e um prognóstico reservado. Padrões de amplificação foram observados em 1q, 3q, 8q e 17q. Anomalias recorrentes nas regiões de 1q21-q22 e 17q12-q22 foram observadas em 56% e 50% das pacientes resistentes, respectivamente. Além disso, 88% das pacientes que apresentaram anomalias em 1q e 17q possuíam o fenótipo de resistência. Sugere-se que essas regiões em 1q e 17q abrigam genes que são mais fortemente relacionados ao prognóstico do que à tumorigênese. Os genes amplificados nos mesmos *amplicons* tais como *ARNT* e *MUC1* em 1q e *LASPI*, *ERBB-2*, *MLN64*, *BRCA1* e *TOP2A* em 17q são propostos para investigação como potenciais biomarcadores de resposta à quimioterapia à base de platina em pacientes com carcinoma de ovário.

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the role of specific chromosomal regions to the acquisition of the platin-resistance phenotype in patients with ovarian carcinoma. Fresh tumor specimens from 24 patients were examined through CGH (comparative genomic hybridization) to determine chromosomal losses and gains. Sixteen patients were refractory to the platin based chemotherapy and 8 patients were sensitive. Clinico-pathological parameters and chromosomal patterns were compared. Patients with the highest number of chromosome alterations were found to present the resistant phenotype and a worsened prognosis. Gene amplification patterns were found at 1q, 3q, 8q and 17q. Recurrent abnormalities spanning the 1q21-q22 and 17q12-q22 regions were found in 56% and 50% of the resistant patients respectively. Moreover 88% of the patients that have shown 1q or 17q alterations displayed the resistant phenotype. We suggest that those regions at 1q and 17q harbor genes that are differentially more related to prognosis instead of tumorigenesis. Genes that are amplified in the same amplicon such as *ARNT* and *MUC1* at 1q and *LSP1*, *ERBB-2*, *MLN64*, *BRCA1* and *TOP2A* at 17q should be investigated as potential markers for chemoresponse to platin based chemotherapy in patients with ovarian carcinomas.

INTRODUÇÃO

1. O câncer de ovário

Entre os tumores ginecológicos, o câncer de ovário é o segundo em número de casos diagnosticados e o primeiro em mortalidade feminina nos Estados Unidos com aproximadamente 16.000 óbitos em 2004 (QUIRK e NATARAJAN, 2005). No Brasil, sua incidência corresponde às taxas observadas em outros países industrializados. Entretanto, como o câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama e o câncer de colo de útero possuem maiores taxas de incidência entre mulheres, sua importância epidemiológica está em sua alta morbi-mortalidade (INCA, 2005).

O pior prognóstico está relacionado, principalmente, ao fato do diagnóstico ser, freqüentemente, tardio, em estádios mais avançados da doença (ROSENTHAL e JACOBS, 1998). Quando o tumor é ainda restrito ao ovário, 80% das pacientes sobrevivem livres da doença cinco anos após o diagnóstico. Entretanto, de uma forma geral e considerando estádios mais avançados, apenas 35% das pacientes sobrevivem após estes 5 anos – taxas estas que não têm sofrido modificações nos últimos anos (BOENTE *et al.*, 1998; LEGGE *et al.*, 2005).

Em 90% dos casos, os tumores de ovário têm origem epitelial, originando-se de células da superfície do epitélio do ovário. O epitélio celômico pode diferenciar-se em seroso, mucinoso (células colunares e ciliadas como das tubas uterinas) ou endometrióide (células colunares não ciliadas, como as do endométrio); embora, freqüentemente, ocorram misturas desses epitélios em um único tumor, variando desde tumores benignos ou tumores *borderline* a tumores malignos (DALY e OBRAMS, 1998). Tumores serosos e mucinosos compõem a vasta maioria das neoplasias ovarianas. Em menor escala, participam os tumores endometrióides, de células claras e o tumor de Brenner (ROBBINS *et al.*, 1996). Os tumores de ovário são classificados histologicamente seguindo recomendações da Organização Mundial de Saúde (SCULLY, 1975) e estadiados através de critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria como FIGO I, II, III e IV - que considera a região afetada pelo tumor, se há expansões para regiões próximas à afetada e, ainda, se há metástases em tecidos distantes (PECORELLI *et al.*, 2001).

Mais recentemente, padrões morfológicos e moleculares foram utilizados conjuntamente na formulação de hipóteses acerca da origem de cada tipo histológico, demonstrando que a atuação diferencial de genes ou família de genes são determinantes para a progressão e diferenciação do tumor, como demonstrado na tabela 1 (BELL, 2005).

Anormalias cromossômicas constituem um importante fenômeno para a gênese e progressão do câncer de ovário sendo que esse tumor apresenta cariótipos complexos e extensa aneuploidia (WATANABE *et al.*, 2001).

Tabela 1- Vias moleculares envolvidas na diferenciação celular em tipos histológicos distintos de carcinoma de ovário.

Tipo histológico	Via proposta
Carcinoma seroso de baixo grau	Via progressiva adenoma-borderline-carcinoma com mutações em <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>
Carcinoma seroso de alto grau	Alterações na superfície de cistos de inclusão, com mutações em <i>TP53</i> e perda de função do <i>BRCA1</i> e/ou <i>BRCA2</i>
Carcinomas mucinosos	Via progressiva adenoma-borderline-carcinoma, com mutações em <i>KRAS</i>
Carcinomas endometrióides	A partir de endometriose, com mutações em <i>CTNNB1</i> e <i>PTEN</i>

Fonte: modificada de Bell, 2005

Para a extensa maioria dos casos, o tratamento da doença consiste em cirurgia seguida de quimioterapia. A radioterapia para o tratamento do câncer de ovário não é prescrita usualmente e aplica-se apenas a alguns poucos casos como, por exemplo, a tumores de células germinativas (DEPPE e BAUMANN, 2000). Cirurgias com preservação do útero e ovário contra-lateral podem ser aplicadas a casos de pacientes em idade reprodutiva e alguns autores sugerem a possibilidade de aplicação desta em pacientes em estágio I da doença (YOUNG e PECORELLI, 1998). O diagnóstico tardio vem acompanhado, na maioria dos casos, do tratamento composto por cirurgia redutiva e quimioterapia adjuvante. A quimioterapia à base de platina pode alcançar, em média, 70% de resposta satisfatória inicial nas pacientes. Entretanto, nos outros casos, as pacientes

podem não responder à terapia (resistência intrínseca) ou ainda tornarem-se refratárias ao tratamento (resistência adquirida), o que resulta em pior prognóstico e sobrevida destas com uma média de 6 a 12 meses (MCGUIRE e OZOLS, 1998). De uma forma geral, a maioria das mulheres com câncer de ovário em estádios avançados apresentam recidiva e morrem em virtude da progressão da doença. Apenas uma minoria, cerca de 20%, atinge a cura à base dos regimes quimioterápicos convencionais (HARTMANN *et al.*, 2005). Quando drogas derivadas da platina são utilizadas como terapia adjuvante no carcinoma de ovário em estágio inicial, obtém-se uma maior sobrevida (VIZZOTTO JUNIOR *et al.*, 2003).

Nos anos 90, o paclitaxel (Taxol®) foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de carcinomas metastáticos de ovário que tivessem baixa resposta à quimioterapia prévia. Estudos comparativos entre os tratamentos à base de paclitaxel e cisplatina, ou cisplatina e ciclofosfamida, demonstraram vantagens superiores no regime baseado em paclitaxel. Dados obtidos através de estudos clínicos em pacientes em estágios avançados da doença e que, impreterivelmente, são submetidas à cirurgia e quimioterapia, demonstraram que a combinação de drogas, principalmente de paclitaxel e cisplatina, apresentam maiores taxas de resposta clínica (73%) e maiores médias para a progressão da doença (18 meses) e sobrevida (38 meses) (OZOLS, 1997).

No CAISM / UNICAMP (Centro de Atenção Integral à Saúde de Mulher), as pacientes diagnosticadas com tumores de ovário em estágios avançados são tratadas, via de regra, por cirurgia redutiva seguida de 6 ciclos de quimioterapia combinada à base de carboplatina (500 mg/m²) e ciclofosfamida (300 mg/m²). Somente alguns casos são tratados com carboplatina (500 mg/m²) associada ao paclitaxel (175 mg/m²), como terapia de segunda linha (HALBE, 2000).

2. A quimioterapia baseada nos derivados da platina

Como relatado no trabalho de FRANCO (2004), as descrições mais antigas sobre o câncer aparecem em sete papiros do Egito antigo que datam de 2500 a.C. e que relatam a realização de uma mastectomia. Posteriormente, Hipócrates, eternizado como o pai da medicina, e Galeno, o mais influente médico do Império Romano, fizeram

considerações sobre o câncer e seu tratamento, que foram referência até o século 16 da era cristã, quando a medicina avançou devido ao movimento Renascentista. Obviamente, após este período, muito se aprendeu sobre os mecanismos e tratamentos do câncer com o desenvolvimento da radioterapia, no século 19, e com a descoberta acidental da mostarda nitrogenada, em meados de 1940, considerada como o início da era moderna da quimioterapia anti-neoplásica (FRANCO, 2004). Os primeiros registros de tratamento quimioterápico efetivo surgiram no final do século XIX, em 1885, com a descoberta da solução de Fowler (arsenito de potássio) por Lissaver e da toxina de Coley, uma combinação de produtos bacterianos em 1890 (BONASSA, 1998).

Durante a 2ª guerra mundial, ocorreu, por acaso, a descoberta dos agentes alquilantes e dos seus efeitos terapêuticos. Em dezembro de 1943, um ataque aéreo alemão destruiu um depósito de gás-mostarda americano em Bari, Itália, originando mielo-depressão intensa entre o grupo de indivíduos contaminados. A partir desse acontecimento, um grupo de farmacologistas clínicos do serviço do Pentágono, nos Estados Unidos, passou a estudar tais agentes e seus possíveis efeitos no tratamento de doenças (BONASSA, 1998). Os agentes alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular. Apesar de serem efetivos como agentes isolados para inúmeras formas de câncer, raramente produzem efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes fase-específicos do ciclo celular. As principais drogas empregadas dessa categoria incluem a mostarda nitrogenada, a mostarda fenil-alanina, a ciclofosfamida, o bussulfam, as nitrosuréias, a cisplatina e o seu análogo carboplatina, e a ifosfamida (INCA, 2005).

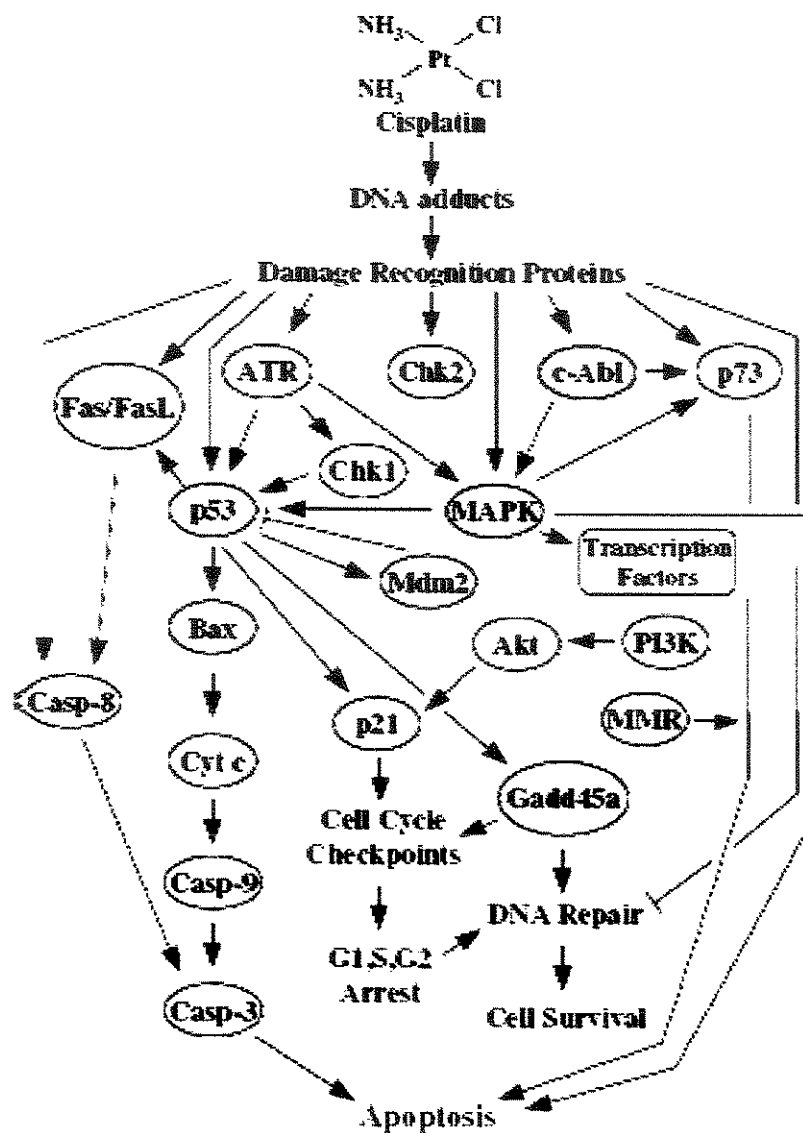
Posteriormente, a partir da década de 40, novos estudos foram surgindo e outras drogas com mecanismos de ações diferentes tiveram seu potencial antineoplásico confirmado, tais como os glicocorticóides, antimetabólitos, inibidores de purinas e pirimidinas, antibióticos e alcalóides da vinca (UCB, 2004). Em 1969, é descoberto o potencial anti-neoplásico da cisplatina. Desde a sua introdução em ensaios clínicos, a cisplatina e seus derivados produziram um impacto importante modificando as perspectivas terapêuticas de vários tumores, entre eles, os tumores de ovário, testículo e cabeça e pescoço (SIDDIK, 2003).

A cisplatina e seus derivados, carboplatina e oxaliplatina, encontram-se na categoria dos quimioterápicos ciclo-específicos atuando em células que se encontram em proliferação (GÓMEZ, *et al.*, 2002).

O DNA é o alvo primário de ação dos derivados da platina (ROBERTS & PERA JR, 1983). Para induzir seus efeitos biológicos, a molécula de platina liga-se ao DNA formando complexos DNA-proteína ou DNA-DNA intra ou entre as duplas fitas gerando adutos e ligações cruzadas (EASTMAN, 1987). Na presença desses complexos que promovem erros na divisão celular, a célula entra em processo de reparo, escapando por duas vias: a de reparo bem sucedido ou a de apoptose. A via metabólica envolvida neste processo conta com mais de 20 proteínas candidatas, como demonstrado na figura 1 (SIDDIK, 2003).

Uma dessas vias metabólicas culmina na ativação de “*checkpoints*” do ciclo celular que, temporariamente, induzem a um curto atraso na fase S, seguido da inibição de outras quinases que promovem um atraso persistente em G2 e M. Esse atraso é aceito como uma consequência dos danos ao DNA promovidos pelas moléculas de platina fazendo com que o complexo NER (*nucleotide excision repair*) seja ativado promovendo a remoção dos adutos e a sobrevivência celular. Entretanto, quando o reparo é incompleto, a célula entra na via apoptótica (SHAPIRO & HARPER, 1999; KUANG *et al.*, 2001; SIDDIK, 2003).

Embora a mediação da proteína p53 nos efeitos tóxicos dos derivados da platina seja uma consequência direta dos danos ao DNA, vários eventos ocorrem para induzir e ativar essa proteína. Um destes eventos é a ativação das quinases atm (*ataxia telangiectasia mutated protein*) e atr (*ATM and Rad3 related protein*) que regulam a estabilidade e a atividade transcripcional da p53 (DAMIA *et al.* 2001).



Fonte: SIDDIK, 2003.

Figura 1- Visão geral das vias metabólicas envolvidas na interação dos derivados da platina na célula, desde a ligação da molecular de platina ao DNA e formação dos adutos até o recrutamento de proteínas específicas de reparo ou escape para a via de apoptose

Mais recentemente, ainda, a proteína atr tem sido verificada na ativação de vias metabólicas específicas da mapk (*mitogen-activated protein kinase*) promovendo a fosforilação da p53. A mapk está envolvida, também, na integração dos sinais extracelulares para regular a proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celulares (DENT e GRANT, 2001).

Vários produtos gênicos são transativados pela p53, em resultado da exposição à platina, e estão associados ao atraso no ciclo celular, reparo e apoptose incluindo p21, gadd45a e o gene *BAX* (HERSHBERGER *et al.*, 2002). A proteína gadd45a associa-se à proteína pcna (*proliferating cell nuclear antigen*) aumentando a atividade do complexo NER (*nucleotide excision repair*), protegendo as células da ação citotóxica da droga. Entretanto, quando o nível de danos ao DNA excede o limite máximo de reparo, a célula favorece a ativação da via de apoptose. Esta via de morte celular é complexa e inicia-se com a translocação da proteína bax do citoplasma para a mitocôndria, onde uma cascata de eventos ativa a via das caspases, resultando na apoptose (WANG *et al.*, 2000).

3. O fenótipo de resistência aos derivados da platina

Embora a platina seja um potente indutor da apoptose, o fenômeno da resistência emerge quando células tumorais tratadas com este agente alquilante falham em entrar em apoptose, em níveis clínicos relevantes da droga. Isso ocorre em consequência de mudanças intracelulares importantes que dificultam a interação entre os derivados da platina e o DNA, com consequente comprometimento das vias de sinalização de erro/reparo e posterior ativação das vias apoptóticas (SIDDIK, 2003).

Ainda que a resistência a platina possa ser explicada por um único mecanismo, é provável que o fenótipo de resistência tenha um caráter multifatorial, em que uma série de mecanismos e vias metabólicas encontram-se imbricados (SIDDIK, 2003). De uma forma geral, e não apenas quanto à resistência aos derivados da platina, são conhecidos alguns mecanismos que atuam para o desenvolvimento da resistência simultânea a múltiplas drogas:

- a) aumento do efluxo da droga após esta já ter entrado na célula tumoral mediado por proteínas relacionadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR);
- b) alterações em moléculas-alvo que irão formar complexos com as drogas quimioterápicas para que estas exerçam seus efeitos, diminuindo, assim, a sua afinidade pela droga quimioterápica;
- c) aumento da atividade dos mecanismos de reparo do DNA levando à inativação de eventuais danos causados pelas medicações antineoplásicas sobre o DNA e/ou extinção da sinalização intracelular de dano ao DNA provocado pelas drogas quimioterápicas;
- d) alterações no mecanismo de morte celular programada ou apoptose;
- e) inativação de genes supressores tumorais, ativação de oncogenes e outros genes – principalmente os participantes de vias metabólicas paralelas e inter-dependentes (GIGLIO, 2001).

Um grande número de proteínas contribui para a manutenção das concentrações intracelulares das drogas. O mecanismo mais estudado é o da glicoproteína P – produto do gene *MDR1*, cromossomicamente localizado em 7q (ÁGUILA *et al.*, 1998). A glicoproteína P é uma proteína transmembrana, que atua como uma bomba ATP-dependente, transportando ativamente compostos de diferentes naturezas para fora das células e impedindo, no caso de quimioterápicos, a sua ação citotóxica (FOJO *et al.*, 1987). Outras proteínas, ainda, incluem: a bcrp (*breast cancer resistance protein*) e a mrp (*Multidrug Resistance-associated Protein*), que apresentam a capacidade de exportar substâncias para o exterior das células, especialmente se estiverem conjugadas à glutathione (STAVROVSKAYA, 1999; WAGNER-SOUZA *et al.*, 2003).

O sistema glutathione (GSH) consiste em um crítico componente de desintoxicação de agentes citostáticos das células. A enzima glutathione S-transferase (gst) catalisa as interações entre os agentes alquilantes e a glutathione, aumentando a taxa de desintoxicação de uma droga. Deste modo, a ativação dessa enzima pode causar o fenótipo

de resistência. A resistência às drogas, mediada pela glp-P, pode estar conectada com alterações no sistema GST, pois células com resistência intermediada pela glp-P apresentam níveis aumentados da enzima gst. Possivelmente, genes envolvidos em diversos sistemas de defesa na célula atuem de forma coordenada, justificando as relações existentes entre os diferentes mecanismos de resistência a drogas (STAVROVSKAYA, 2000).

Devido à sua complexidade e ao envolvimento de várias moléculas, alterações em genes e proteínas que resultem em alterações das vias apoptóticas – direta ou indiretamente –, talvez constituam o mecanismo de maior impacto nas taxas de resposta ao tratamento com derivados da platina. Essas alterações podem vir a serem deflagradas por mutações ou, ainda, por amplificações, deleções e rupturas de genes – em translocações balanceadas ou não. Desta forma, torna-se importante o estudo de perfis citogenéticos e do grau de instabilidade genômica de um determinado tumor, para a possível correlação de achados e biomarcadores com o fenótipo resistente e refratário ao tratamento.

Mutações, polimorfismos e deleções são comumente descritos para o gene supressor tumoral *TP53* que está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1). A expressão de sua forma alterada é o defeito genético mais comumente identificado em tumores malignos humanos. Em uma célula normal, sua função relaciona-se à produção de proteínas que atuam na regulação do crescimento celular, controle dos danos e facilitação do reparo do DNA (WILLIAMS JR. *et al.*, 1999). O gene *TP53* é ativado em resposta a sinais de danos celulares. Seu fator de transcrição interage com outros genes e, em algumas dessas interações, ocorre a promoção da parada do ciclo celular na fase G1, portanto, antes de ocorrer a duplicação do DNA (fase S), permitindo o reparo do DNA danificado. Em casos de danos não reparados, a proteína p53 induz a apoptose. Além disso, a p53 também promove um “*checkpoint*” da fase S para a G2 (FETT-CONTE e SALLES, 2002). O *TP53* ativado consegue estimular genes como, por exemplo, o *BAX* que acarretarão mudanças no potencial da membrana mitocondrial, liberando para o citoplasma moléculas de citocromo C que, por sua vez, ativarão as caspases e induzirão o processo apoptótico. Um dos moduladores desse mecanismo é o gene *BCL-2* que pode alterar a liberação de citocromo C pela membrana mitocondrial (GIGLIO, 2001).

A p53 mutante parece dominar sobre o tipo-selvagem da proteína sendo pobremente degradada na célula, resultando no superacúmulo e superexpressão da proteína mutante produto de *TP53* (WILLIAMS JR. *et al.*, 1999). Embora o *TP53* seja considerado um gene supressor de tumor, pois a maioria das mutações leva à perda de função, ele pode sofrer mutações que atuam como esse efeito negativo dominante, citado acima, ou seja, o produto do único alelo mutado interage e inativa o alelo normal, induzindo o câncer e atuando, portanto, como um oncogene. (FETT-CONTE e SALLES, 2002).

Outro gene envolvido em processos de resistência à quimioterapia é o oncogene *C-MYC* (PELENGARIS e KHAN, 2003). Em situações anormais, pode ser ativado por diversos mecanismos, entre eles translocações com justaposição do gene que se encontra no cromossomo 8q24, a genes de imunoglobulina localizados nos cromossomos 2, 14 ou 22 e, também, por amplificação. O gene *C-MYC* encontra-se amplificado em vários tipos de cânceres, incluindo carcinomas de pulmão, mama e casos raros de carcinoma de cólon. Além disso, mutações de ponto do gene também têm sido descritas (BISHOP & WEINBERG, 1996).

Especialmente no câncer de ovário, o gene que mais vem sendo relacionado à resistência à quimioterapia e a um prognóstico reservado é o *ERBB-2*, também conhecido como *HER-2/neu*. TÊTTO *et al.* (1998) encontraram uma associação entre a expressão do *ERBB-2* com resistência à quimioterapia citotóxica, como a ciclofosfamida/metotrexato. CHUNG *et al.* (2002) relacionaram a expressão do *ERBB-2* com resistência à terapia endócrina do câncer de mama com tamoxifeno, devido à provável interação direta do produto gênico com receptores de estrogênio localizados na membrana plasmática. Tumores que apresentam a superexpressão da proteína codificada pelo *ERBB-2* ainda podem apresentar resistência a múltiplas drogas de maneira indireta, uma vez que a proliferação celular torna-se descontrolada, conferindo ao tumor uma “maior malignidade” e, conseqüentemente, tornando-o resistente ao tratamento quimioterápico.

Considerando o processo de malignização neoplásica, há hipóteses que propõem que o fenótipo de resistência à platina seria, na verdade, mais uma aquisição do tumor, neste processo. Kruh (2003) postula que a resistência ao tratamento nada mais é que uma manifestação do câncer. As mutações somáticas, associadas à plasticidade e

instabilidade genômicas adquiridas na carcinogênese, são a base para o desenvolvimento deste fenótipo. Em linhas gerais, a expectativa é de que, em algum momento do processo gerado pelo acúmulo de alterações, qualquer tumor apresente-se refratário ao tratamento, seja de forma intrínseca ou adquirida (KRUH, 2003).

O desafio torna-se, portanto, entender em que momento este processo é deflagrado, diferenciando quais mutações e alterações genômicas estão envolvidas na carcinogênese e progressão tumoral daquelas envolvidas na resposta e no prognóstico.

4. A citogenética molecular na detecção da instabilidade genômica

O termo “resistência adquirida a drogas” é usado para descrever populações celulares, previamente sensíveis a drogas e que adquirem o fenótipo de resistência. Esta forma de resistência parece ter origem multifatorial, mas mutação e seleção contra genes que conferem proteção são centrais neste processo (SOOD & BULLER, 1998). Prevê-se, com isso, que os fenômenos de resistência às drogas assim como o silenciamento e/ou super-expressão de genes sejam resultado de alterações genéticas e citogenéticas e eventos particularmente afins.

A técnica de cariótipo através do bandamento G, apesar de ser acessível em praticamente todos os grandes centros de estudo do câncer, revelou-se pouco informativa, nos casos de tumores avançados devido às dificuldades de manejo no cultivo celular, obtenção de metáfases de boa qualidade e devido aos complexos rearranjos presentes (TIBILETTI *et al.*, 2003).

Novas técnicas em citogenética foram desenvolvidas nestes últimos anos da “era molecular da ciência”. Em meados dos anos 80, iniciaram-se os estudos de hibridização de sequências de DNA específicas a cromossomos, culminando com o advento das técnicas de hibridização *in situ* através de corantes fluorescentes. Esta técnica, chamada de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) permitiu a localização precisa de sequências de DNA de interesse nos cromossomos. Hoje, é possível empregar a técnica de FISH a um imenso espectro de amostras e com a possibilidade de investigação de sequências não apenas em metáfases, mas em núcleos em interfase, dispensando a necessidade de cultivo celular prévio.

Desenvolvida em 1992, a hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization – CGH*) consiste na hibridização competitiva de DNA tumoral e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes, a metáfases normais fixadas em lâmina, permitindo a investigação do genoma total para ganhos e perdas de regiões cromossômicas. Por não ser necessária a obtenção de metáfases do tumor a ser investigado e por permitir extração de DNA de praticamente todos os tipos de tecidos, mesmo aqueles incluídos em parafina, a técnica torna-se útil por permitir uma visão geral e informativa do genoma. Entretanto, o delineamento de bandas e regiões específicas é limitado pela resolução dos cromossomos metafásicos. É possível identificar ganho de uma região no braço curto ou longo, em regiões proximais ou distais sem, no entanto, permitir a identificação de uma ou mais bandas específicas com segurança. Estima-se que o poder de resolução da CGH seja de 5 a 10 MB e que esta resolução esteja intimamente ligada à resolução dos cromossomos a que os DNAs são hibridizados (KALLIONIEMI *et al.*, 1992).

Apesar de alguns mecanismos relacionados à resistência a drogas serem conhecidos, poucas foram as moléculas associadas. Além disso, não existem dados conclusivos acerca de regiões específicas cuja amplificação, deleção ou ainda translocação possam estar associadas positivamente à resistência intrínseca e adquirida.

Sabe-se que a evolução tumoral para fenótipos mais expressivos de malignidade envolve múltiplas alterações genéticas, várias delas observadas na análise citogenética. Frequentemente, tumores em estágio avançado apresentam poliploidias, aneuploidias, deleções, amplificações, cromossomos marcadores e eventos como translocações complexas, balanceadas ou não. Com essas ocorrências, o equilíbrio dissômico celular é profundamente atingido, resultando no fenótipo agressivo das células tumorais (HEINRICH, 2001; TIBILETTI *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, especialmente após 2002, vários trabalhos foram publicados utilizando CGH para a detecção de regiões candidatas e relacionadas à tumorigênese, resposta ao tratamento, resistência quimioterápica aos derivados da platina e fatores prognósticos no câncer de ovário.

De uma forma geral, Kiechle e colaboradores (2001) sugeriram que as regiões mais comumente envolvidas para ganho seriam 1q, 8q, 20q, 3q e 19p e para perda 13q, 4q, 5q e 18q, dados estes corroborados pelos grupos de Hauptmann e Hu, conforme observado nas tabelas 2 e 3 (KIECHLE *et al.*, 2001; HAUPTMANN *et al.*, 2002, HU *et al.*, 2003).

Hu e colaboradores (2003) observaram que o tempo de sobrevida das pacientes correlaciona-se inversamente ao número de alterações cromossômicas encontradas nos tumores. É interessante notar que, nesse mesmo estudo, 85% dos tumores apresentaram ganho nas regiões 2p e 8q, exatamente onde os genes *N-MYC* e *C-MYC* estão localizados, indicando uma forte associação deste gene à patogênese dos tumores de ovário (HU *et al.*, 2003). Alterações em 8q também foram observadas pelos grupos de Tapper, Patael-Karasik e Israeli, em estudos envolvendo tumores esporádicos e tumores familiares com mutações de BRCA1 e 2, investigados por CGH (tabela 4) (TAPPER *et al.*, 1998, PATAEL-KARASIK *et al.*, 2000, ISRAELI *et al.*, 2003). O número médio de perdas e ganhos foi significativamente maior nos tumores familiares, comparados ao grupo de tumores esporádicos (ISRAELI *et al.*, 2003).

Tabela 2- Alterações Cromossômicas em 47 Carcinomas de Ovário

Tipo de Tumor	Ganhos	Perdas
Adenomas		1p36, 19, 22
Tumores LMP	3p26, 4q, 5q14-q22, 6q, 9p, 12q21, 13q21	1p32-36, 8q, 9q, 16p, 19, 22
Carcinomas Serosos (Baixo grau histológico)	1q41-q42, 1q23, 3q13, 3q24-qter, 6p22, 8q	4q25-qter, 6q22-q23, 12q21-q22, 13q21-q22, 16q21-q24
Carcinomas Serosos (Alto grau histológico)	1q22-q31, 1q32-qter, 2p11-p13, 3q, 4p13-p15, 5p15, 6p12-pter, 7q31-q35, 8q, 10p12-p15, 10q21-q23, 12p, 12q11-q14, 15q26, 18p11, 20p, 20q11-q13	4p13-p15, 5q14-q23, 6q22-q24, 8p, 9p12-p23, 9q13-q34, 13q14, 14q22-p12, 18q12-qter, 21q21-q22
DESTAQUES	3q13-qter, 5p14-pter, 6p22-pter, 8q22-qter, 10p, 12p	8p12-p23, 21q21-q22
Carcinomas não serosos	20p13, 20q13	4q22-q32, 8p21-p22, 13q21-q31
DESTAQUES	3q24-q27, 6q22, 7q33-qter, 13q32-qter, 20p13-q13	8q23, 13q21-q22

Fonte: modificada de KIECHLE *et al.*, 2001 e HAUPTMANN *et al.*, 2002.

Tabela 3- Ganhos e perdas em 20 carcinomas serosos primários e recorrentes.

	Ganhos	Perdas
Total de tumores	1q41-q44, 8q22-q24, 19p12-q13.1, Xp11.2-q13, 4q31-q35, Xp21-20q12-q13, 3q26-q29, 12p12-p13, p22.3, 18q22-q23, 13q22-q31, 2p22-p25, 7p14-p21, 5p15.2-p15.3, 9p22-p24, 16q22-q24, 17q22-q25	
Perdas e Ganhos em Grande número de cópias	1q41-q44, 2p22-p25, 3q26-q29, 19p12-q13.1	
Tumores com Recorrência	2p22-p25, 19p12-q13.1, 20q12-q13, 5q14-q22	

Fonte: modificada de HU *et al.*, 2003.

Tabela 4- Alterações cromossômicas em 19 tumores familiares e 27 esporádicos.

	Ganhos	Perdas
Esporádicos		(nenhuma específica apontada)
Portadoras Mutação BRCA1	8q24.1-ter, 3q	9 e 19
Portadoras Mutação BRCA2	e 2q24-q32	16 e 22

Fonte: modificada de TAPPER *et al.*, 1998,

PATAEL-KARASIK *et al.*, 2000, ISRAELI *et al.*, 2003.

Ganho em alto número de cópias também foi verificado nas regiões 1q, 3q e no cromossomo 19, onde se localizam alguns outros genes que podem ter interesse clínico-prognóstico como eIF-5A2 (fator eucariótico de iniciação 5A2), PIK3CA (phosphatidylinositol 3 kinase), na região 3q26, e o AKT2, na região 19q13.1-q13.2 (GUAN *et al.*, 2004).

A análise dos pontos de quebra mais recorrentes, realizada por Rao e colaboradores, permite-nos propor uma série de genes que poderiam estar envolvidos na patogênese dos carcinomas de ovário. Entretanto, se compararmos os dados do grupo de Rao e os dados apresentados pelo grupo de Takano, na análise de tumores sensíveis e

resistentes à cisplatina, verificamos que os loci propostos pelo primeiro e que abrigariam perdas ou ganhos genômicos não são os loci propostos pelo segundo, com os pontos de quebra mais freqüentes (TAKANO *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2002).

Tabela 5- Alterações Cromossômicas em 28 carcinomas de ovário (tumores resistentes e sensíveis à cisplatina)

	Ganhos	Perdas
Tumores Resistentes	1q21-q22, 6q21-q25, 13q12-q14.	7q21-q36, 10q12-q15

Fonte: modificada de TAKANO *et al.*, 2001.

Tabela 6- SKY (Cariótipo Espectral) em 7 adenocarcinomas serosos

Pontos de Quebras	1p36, 2p11, 2p23, 3p21, 3q21, 4p11, 6q11, 8p11, 9q34, 10p11, 11p11,
Recorrentes	11q13, 12p13, 12q13, 17q21, 18p11, 18q11, 20q11, 21q22
Deleções Intersticiais	8p11, 11p11 e 12q13

Fonte: modificada de RAO *et al.*, 2002.

Os trabalhos publicados indicam grande heterogeneidade no mapeamento de regiões, por CGH, que possam estar relacionadas a tumorigênese, progressão da doença e resposta ao tratamento. Essas diferenças são devidas à heterogeneidade já conhecida dos tumores de ovário e à inclusão de diferentes tipos histológicos, graus de diferenciação e estadiamento dos tumores, sendo que nenhum trabalho concentrou-se em avaliar um grupo específico de pacientes. Com isso, a possibilidade de utilização da técnica de CGH para caracterizar um grupo específico de pacientes, com características clínicas semelhantes, para a disponibilização de biomarcadores é promissora.

A técnica convencional de CGH, denominada mCGH (baseada em metáfases), gera várias possibilidades quanto às regiões que poderiam ser correlacionadas a um determinado fenótipo. Entretanto, a resolução da técnica convencional pode apenas indicar

regiões cromossômicas candidatas onde vários genes estão inseridos (JACOBSEN *et al.*, 2000). Para que, de fato, seja possível conhecer-se qual ou quais os genes contidos nessas regiões e que estariam relacionados à determinada característica, outras técnicas de maior resolução podem atuar complementarmente como a FISH (*fluorescence in situ hybridization*) ou, ainda, a mais recente, aCGH (*CGH-arrays*) (MAKHIIJA *et al.*, 2003).

Os aCGH foram criados para aumentar substancialmente a resolução da mCGH. Estes *arrays* utilizam grandes insertos, contidos em BACs (*bacterial artificial chromosomes*) como alvos na lâmina, ao invés de metáfases, como na mCGH. O primeiro *array* para mapear o genoma inteiro foi construído em 2001 pelo grupo de Snijders, contendo aproximadamente 2.400 clones (SNIJDERS *et al.*, 2001). Mais recentemente, o mesmo grupo construiu um *array* com aproximadamente 32.000 clones sobrepostos em uma técnica denominada “*tiling resolution array*” que deverá estar disponível comercialmente em breve. Teoricamente, os fragmentos utilizados no *Tiling Array* cobririam regiões contíguas no genoma e, com isso, todas as possibilidades de regiões onde houvesse um gene (ISHKANIAN *et al.*, 2004).

Apesar de muito informativos, os aCGH e os *Tiling Arrays* ainda não estão disponíveis a todos os laboratórios, em qualquer centro de pesquisa. Por outro lado, a utilização de seqüências de interesse específicas em arrays feitos sob medida para um determinado experimento torna esta abordagem possível à praticamente qualquer laboratório de citogenética que mantenha contato com outros centros de pesquisa no mundo.

Após a escolha e confirmação de regiões e/ou genes específicos, entretanto, estas seqüências precisam ser validadas em um grande número de pacientes, lembrando que a abordagem através dos *arrays*, apesar de informativa, é bastante cara.

Se as pesquisas atuais puderem apontar genes específicos relacionados a um determinado fenótipo, como em nosso caso – a resistência aos derivados da platina –, “assinaturas moleculares” das pacientes poderão ser obtidas logo após o diagnóstico do tumor, para que estratégias assertivas de tratamento e seguimento possam ser propostas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar o perfil de perdas e ganhos genômicos detectados por CGH (hibridização genômica comparativa) de pacientes portadoras de carcinoma de ovário e submetidas à quimioterapia à base de platina.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar os padrões de perdas e ganhos genômicos mais frequentes em pacientes com carcinoma de ovário.
2. Caracterizar os padrões de perdas e ganhos genômicos que, nessas pacientes, poderiam estar associados ao fenótipo de resistência à platina.
3. Identificar as regiões cromossômicas associadas ao fenótipo de resistência intrínseca à platina e, com os dados da literatura, propor marcadores citogenéticos associados à resposta à quimioterapia.

ARTIGO ORIGINAL

Artigo original submetido à Gynecologic Oncology em junho de 2005

**Amplification patterns at 1q21-q22 and 17q12-q22 as potential targets for
platin-resistance in ovarian cancer**

Juliana Karina Heinrich^a, Luiz Carlos Teixeira^b, Liliana Lucci de Angelo Andrade^c,

Irene Chagas^d, Valmir Pessoa^d, Fátima Böttcher-Luiz^b

^a CAISM – Women's Hospital at the Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

^b Gynecology and Obstetrics Department at the Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

^c Pathology Department at the Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

^d Molecular Genetics Laboratory at the Universidade de São Paulo – USP

Running title: 1q and 17q role on the platin resistance phenotype

Key words: platin, cgh, ovarian cancer and chemoresistance

Corresponding Author

Juliana Heinrich

Rua Emerson José Moreira, 1372

Phone: 55 19 3788-9524

FAX: 55 19 3788-9395

Email: juliana.heinrich@terra.com.br



ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of the study was to investigate the role of specific chromosomal regions to the acquisition of the platin-resistance phenotype in patients with ovarian carcinoma.

METHODS: Fresh tumor specimens from 24 patients were examined through CGH (comparative genomic hybridization) to determine chromosomal losses and gains. Sixteen patients were refractory to the platin based chemotherapy and 8 patients were sensitive. Clinicopathological parameters and chromosomal patterns were compared.

RESULTS: Patients with the highest number of chromosome alterations were found to present the resistant phenotype and a worsened prognosis. Gene amplification patterns were found at 1q, 3q, 8q and 17q. Recurrent abnormalities spanning the 1q21-q22 and 17q12-q22 regions were found in 56% and 50% of the resistant patients respectively. Moreover 88% of the patients that have shown 1q or 17q alterations displayed the resistant phenotype.

CONCLUSIONS: We suggest that those regions at 1q and 17q harbor genes that are differentially more related to prognosis instead of tumorigenesis. Genes that are amplified in the same amplicon such as *ARNT* and *MUC1* at 1q and *LSP1*, *ERBB-2*, *MLN64*, *BRCA1* and *TOP2A* at 17q should be investigated as potential markers for chemoresponse to platin based chemotherapy in patients with ovarian carcinomas.

1. INTRODUCTION

The incidence of cancer among women in Brazil corresponds to estimatives of other industrialized countries around the world [1]. Ovarian cancer is not among the most incident types of cancers but is one of the leading causes of death among women with gynecological malignancies and still a major challenge for the clinician especially due to its late diagnosis and some treatment issues. Most cases are diagnosed at an advanced stage and the majority of patients present metastasis at the primary surgery [2,3]. The standard

treatment follows the international consensus of cytoreductive surgery and platin-based chemotherapy although a chemoresistance phenotype is present in around 30% of patients. Chemoresistance is the main reason for failure of cancer therapy leading to patient death [4]. The mechanism underlying cisplatin resistance in ovarian cancer is not yet fully understood although many genes and proteins such as *ERBB-2*, *TP53*, *BAX*, *BCL-2*, *BRCA-1*, *RAS*, *MAPK*, *gadd45a*, *p21* and many others were shown to be involved at some point in different pathways contributing to the development of the resistant phenotype [5]. Hypothetically the resistance phenotype arises in a cancer cell as the mutation rate becomes too high and uncontrolled changing the genetic elements that control cell sensitivity to a given drug as if it would be expected that at some point any tumor would show some type of intrinsic or acquired chemoresistance [6]. Previous studies are pointing to some promising protein targets for platin resistance in ovarian cancer such as the proteins *xist*, *muc1*, *ddg*, the *gsts* and the microsatellite marker D61581 among others [7,2,8,9,10,11]. Although many groups have been working on expression profiling, some others have found cytogenetic markers that could predict platin based chemotherapy response and/or prognosis such as gains at 1q21-q22, 6p, 6q21-q25, 7q, 13q12-q14, 17q and losses at 7q21-q36, 10q12-q15, 15q, 17p, 18q, 21q [12,13].

Like most tumors, ovarian cancer has been shown to be a monoclonal tumor where somatic mutations affecting several gene families promote cell proliferation. According to it one could accept that metastasis capability and the chemoresistance phenotype would arise from novel somatic genetic alterations from variant subclones within the primary tumor [3]. Although many authors have shown possible chromosomal regions involved at the onset of ovarian cancer there is still a lack of information on which abnormalities would contribute to its tumorigenesis and which ones could be accounted for differential phenotypes such as the resistance to platin, the chemotherapy agent of choice for ovarian cancer. To gain insight whether gene amplification and/or deletion participate on the chemoresistance phenotype we have studied a subset of 24 ovarian carcinomas of serous and mucinous type with very similar clinical and treatment features in an attempt to differentiate gene profiles that are involved on treatment response and/or prognosis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients and tumor samples

Patients with ovarian cancer who have undergone surgery at the Women's Hospital (CAISM) and who have signed an informed consent were eligible for participation. The study was approved by the institutional and National Ethics Committee.

Fragments obtained from the primary tumor and selected by the pathologist immediately after surgery were frozen immediately and stored in liquid nitrogen until processed. Twenty four samples were selected for CGH according to the availability of the clinical records and follow up information and according to the extracted DNA quality.

Patients who have received platin associated with ciclophosphamide and/or paclitaxel were eligible. Patients were assigned as chemoresistant if any tumoral activity – verified through the increase of CA125 levels and/or clinical symptoms - was found until 6 months of the last chemotherapy course [14]. Only ovarian carcinomas of serous and mucinous histological types were included.

2.2 CGH

Standard phenol-chloroform DNA extraction with alcohol precipitation was carried out after tissue digestion with 0,12 mg/ml proteinase K (Invitrogen, USA) overnight. The conservation of high molecular weight at the extracted DNA was examined through a 1% agarose electrophoresis gel.

Normal lymphocyte metaphases were obtained according to routine protocols for karyotyping. DNA indirect labeling of tumor (target- green) and normal (reference-red) DNA and hybridization was carried out as described elsewhere [15]. Reversal labeling was carried out whenever possible to check the CGH results. Briefly, equal amounts of tumor and normal DNAs were ethanol-precipitated with unlabeled Cot-1 DNA, dissolved in hybridization buffer (50% formamide/10% dextran sulfate/ 2XSSC, pH 7), denatured at 75°C for 5 minutes and applied into normal lymphocyte metaphase preparations. The

hybridization procedure took place at 37°C for 72 hours in a humid chamber. Post hybridization washes included 0.4XSSC at 75°C for 2 minutes and 0,1% NP-40, 2XSSC for 2 minutes at room temperature. Counterstaining was achieved with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI – Vector Laboratories) in an antifade solution.

Image analysis was performed by either two different CGH softwares: Cytovision (Applied Imaging, San Jose, CA, USA) and CGH View (Applied Spectral Imaging, San Diego, CA, USA) coupled in an Olympus (Tokyo, Japan) or Zeiss (Jena, Germany) fluorescence microscopes. Target regions were defined according to the green/red ratio. Chromosomal regions where the mean ratio was below 0.8 were considered to reflect losses of DNA and regions where the mean ratio was above 1.2 were considered to reflect gains. High-level amplification was assigned if the ratio exceeded 1.5.

3. RESULTS

Gains and losses profiles of each analyzed patient as well as high-level amplifications details are summarized on table 1. Nineteen tumors were of serous histological type and five were of mucinous type. The mean age of patients at diagnosis was 57.6 years (32-72). Follow up data and clinical information on the chemotherapy treatment response were obtained at the patient's records. Eleven patients have died due to the disease and one has died due to a secondary cause.

The average number of chromosomal alterations was 6.8 (2-18) and didn't seem to differ according to the histological type. Two patients who presented the highest number of amplifications (16 and 18) have died of the disease and presented a suggestive chemoresistant phenotype. One of these also presented the youngest age at diagnosis (32 yo). The number of detected deletions was lower than the amplifications.

The most recurrent abnormalities were found on chromosomes 1q and 17q. Abnormalities involving both short and long arms of chromosome 6 were observed and also on 2q, 3q and 8q although not as frequent as abnormalities in 1q and 17q. The frequency of chromosome 1 and chromosome 17 aberrations was similar: 42% (10/24)

although short-arm aberrations were found. One patient has shown gain at 1p12 and another at 17p22-pter. Among the 16 resistant patients 56% (9/16) have displayed alterations at 1q and 50% (8/16) at 17q. Moreover 88% (8/9) of the patients who have displayed 1q alterations and 88% at 17q presented the resistant phenotype. The frequency distribution of chromosome abnormalities according to each patient and to each chromosome is shown on graphic 1 where the chromosome 23 stands for chromosome X. A diagrammatic representation of the recurrent chromosome regions of amplification at 1q and for chromosome 17 is shown on figures 1 and 2.

4. DISCUSSION

The study of chromosomal abnormalities in cancer cells is usually taken for granted in a genomic and proteomic era although it is remarkably known that new generation drugs such as Herceptin and Glivec were conceived based on the cytogenetical findings of the *ERBB-2* gene amplification and the well known Philadelphia chromosome [16].

Many previous authors have shown the association of genes such as *ERBB-2*, *TP53* and *BCL-2*, the chemoresistant phenotype and/or a poor prognosis but none to date have become a potent predictor of chemoresponse with clinical use [7, 2, 8, 9, 10, 11]. The number of cytogenetical alterations in our samples ranged from 2 to 18. The patient with 12 alterations has currently progressive disease and the patients with 16 and 18 alterations have died within the 6 month-evaluation period after the last chemotherapy course. Although our study cannot provide statistical data to support any association at this time, many others have been showing the impact of the number of chromosomal alterations on the overall survival rates and/or with survival time of the patients [17, 18, 19] showing that the CGH technique might help to select patients regarding their number of alterations onto better or worsened prognosis groups.

We failed to detect amplification at 20q12 as reported by others [20, 21, 18]. One possible reason is that we have analyzed primary tumors instead of recurrence sites or metastasis and this alteration has been associated to high risk for recurrence not only in ovarian cancer but also in thyroid cancer [22]. One could hypothesize that 20q12 gain is a

later abnormality acquisition and might be related to disease progression. Also in our sample we have not identified recurrent alterations spanning the 7q11.2-q21 region of the gene *MDR1* which might suggest that although frequently involved in chemoresistant phenotypes in other cancers, MDR1-related resistance due to gene amplification is not a frequent event in ovarian cancer. The *MDR1* gene codes for the P-glicoprotein (pgp), that works as an ATP-dependent drug pump and prevents the cytotoxic activity of a given drug by changing its concentration in the cell. Recently it was demonstrated that pgp interference RNAs (siRNAs) were able to reverse the resistance of ovarian carcinomas as effective inhibitors of MDR gene expression [23]. Although not based on gene amplification profiles but on post transcriptional issues that could have led to an increase on pgp levels, siRNAs may become a novel therapeutic tool for the treatment of ovarian carcinomas.

We confirmed 8q alterations in our samples supporting other authors. Abnormalities at 8q specially if spanning the *C-MYC* oncogene at 8q24 are widely found in different types of tumors so the hypothesis is that 8q is an early step for ovarian cancer tumorigenesis [24,3].

Our findings reinforce the hypothesis that 1q and 17q harbor important genes related to platin resistance as 88% of our resistant patients displayed alterations in any of these two regions. In our samples these amplifications seemed to happen independently although two patients have shown concomitant amplification at 1q and 17q.

Some groups have been focused recently on the amplification of 1q21-q22 and especially on the role of the muc1 protein whose locus is localized in this region. We have confirmed the high frequency of this amplification among the resistant patients although a larger amplification pattern until 1q23-q24 was also verified [25, 12]. The muc1 protein has been found to be overexpressed in a variety of tumors including breast and ovary [26,9]. This protein plays an inhibitory role to E-cadherin and beta-catenin mediated cell interactions which would facilitate metastasis [27,28,36]. Immunohistochemical and/or FISH studies with a MUC1 gene probe in a larger number of samples would help to elucidate the specific role of the protein for the worsened prognosis.

Also in the same amplicon at 1q21 is localized the *ARNT* gene. *ARNT* serves as the dimerization partner for a number of other proteins, whose activity is modulated by exogenous chemicals. These complexes activate transcription of several genes involved in metabolism of foreign chemicals [29]. We might infer that genes at this region are important for the chemoresistant phenotype although other targets have to be checked at 1q21.

The chromosomal region 17q12-q21 harbors an amplicon that is frequently related to be amplified in breast cancer [30,31] but to the best of our knowledge not yet proven to be related to a specific phenotype in ovarian cancer. This amplicon contains the *ERBB-2* gene but also others such as *LASPI*, *MLN64* and more distally the *BRCA1* gene [29,31].

At 17q21-q22 is also localized the *TOP2A* gene. This gene encodes a DNA topoisomerase, an enzyme that controls and alters the topologic states of DNA during transcription. This enzyme is involved in processes such as chromosome condensation, chromatid separation, and the relief of torsional stress that occurs during DNA transcription and replication. It catalyzes the transient breaking and rejoining of two strands of duplex DNA which allows the strands to pass through one another, thus altering the topology of DNA. Two forms of this enzyme exist as likely products of a gene duplication event. The gene encoding this form, alpha, is localized to chromosome 17 and the beta gene is localized to chromosome 3. The gene encoding this enzyme functions as the target for several anticancer agents and a variety of mutations in this gene have been associated with the development of drug resistance [31]. Although the *TOP2A* is found to be related to doxorubicin resistance [32] and changes in expression levels of *TOP2A* was associated with the ovarian carcinoma cells responsiveness to paclitaxel [33], the role of this gene at platin resistant ovarian cancers is yet to be explained and needs further investigation.

Our results are preliminary but of vital importance to delineate targets for further analysis. One possible approach would be to investigate the 1q21-q22 amplification pattern in a larger number of resistant patients. Another to investigate the participation of the large “*ERBB-2* amplicon”. The *ERBB-2* gene is found to be amplified in around 30% of ovarian cancer patients and is related to a worsened prognosis [34,35]. The study of the

gene boundaries and other genes that might have been amplified with the *ERBB-2* gene will help to understand the role of this amplicon and its relationship with the chemoresponsive phenotype and prognosis.

Nine out of 16 patients (56%) in our study displayed overrepresentation of a region that includes the genes *LASP1*, *ERBB-2*, *MLN64*, *BRCA1* and *TOP2A* suggesting that amplification of any of them or all of them together might lead to a resistant phenotype.

Our results and the genomic data published by other authors support the thesis that the oncogene amplification and genetic instability pathways are one of the major mechanisms capable of activating or down-regulating many genes implicated in the platin resistant phenotype in ovarian cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr Christine Hackel and Cassia Campanhol for their technical support on DNA extractions, Mario Sergio Montani for technical support on the hybridizations and Dr Ann Fox for her helpful comments. This study was supported by FAPESP – Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo.

REFERENCES

- [1] INCA, 2005. Instituto Nacional do Câncer (National Cancer Institute). Accessed in June 2005 <<http://www.inca.gov.br>>
- [2] Makhija S, Sit A, Edwards R, Aufman K, Weiss H, Kanbour-Shakir A, Gooding W, D'Angelo G, Ferrell R, Raja S, Godfrey TE. Identification of genetic alterations related to chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90:3-9.
- [3] Israeli O, Gotlieb WH, Friedman E, Korach J, Friedman E, Goldman B, Zeltser A, Ben-baruch G, Rienstein S, Aviram-Goldring A. Genomic Analyses of primary and metastatic serous epithelial ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 154:16-21.

- [4] Lonning E. Genes causing inherited cancer as beacons to identify the mechanisms of chemoresistance. *Trends Mol Med* 2004; 10(3): 113-118.
- [5] Siddik, ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-79.
- [6] Kruh, GD. Introduction to resistance to anticancer drugs. *Oncogene* 2003; 22:7762-4.
- [7] Huang K, Rao PH, Lau CC, Heard E, Ng S, Brown C, Mok SC, Berkowitz RS, Ng S. Relationship of XIIST expression and responses of ovarian cancer to chemotherapy. *Mol Cancer Therap* 2002; 1: 769-776.
- [8] Selvanayagam ZE, Cheung TH, Wei N, Vittal R, Lo KWK, Yeo W, et al. Prediction of chemotherapeutic response in ovarian cancer with DNA microarray expression profiling. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 154: 63-66.
- [9] Takano M, Fujii K, Kita T, Kikuchi Y, Uchida K. Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; 12: 1177-82.
- [10] Chen Y, Yuan C, Chow K, Wang P, Lai C, Yen, M, Wang, L. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase is associated with cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 110-7.
- [11] Hartmann LC, Lu KH, Linette GP, Cliby WA, Kalli KR, Gershenson D, et al. Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2149:2155.
- [12] Takano M, Kudo K, Goto T, Yamamoto K, Kita T, Kikuchi Y. Analysis by comparative genomic hybridization of genes relating with cisplatin-resistance in ovarian cancer. *Hum Cell* 2001; 14(4):267-71.
- [13] Hauptmann S, Denkert C, Koch I, Petersen S, Schluns K, Reles A, et al. Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 2002; 33(6):632-41.

- [14] Blackledge G, Lawton F, Redman C, Kelly K. Response of patients in phase II studies of chemotherapy in ovarian cancer: implications for patient treatment and the design of phase II trials. *Br J Cancer* 1989, 59(4): 650-3.
- [15] Bayani J, Brenton JD, MacGregor PF, Beheshti B, Albert M, Nallainathan D, et al. Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays. *Cancer Res* 2002; 62(12):3466-76.
- [16] Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, Rolfe M, Linette GP, Stec J, et al. Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol* 2004;122(4):598-609.
- [17] Kiechle M, Jacobsen A, Schwarz-Boeger U, Hedderich J, Pfisterer J, Arnold M. Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer* 2001; 91(3):534-40.
- [18] Hu J, Khanna V, Jones MW, Surti U. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas: comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 89(3):369-75.
- [19] Bergamo NA, Veija LCS, Reis PP, Nishimoto IN, Magrin J, Kowalski LP, et al. Classic and molecular cytogenetic analyses reveal chromosomal gains and losses correlated with survival in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 621-631.
- [20] Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, et al. Genetic analysis of benign, low-grade and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1672-80.
- [21] Wang N. Cytogenetics and Molecular genetics of ovarian cancer. *Am J Med Gen* 2002; 115: 157-63.
- [22] Wada N, Duh QY, Miura D, Brunaud L, Wong MG, Clark OH. Chromosomal aberrations by comparative genomic hybridization in hurthle cell thyroid carcinomas are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(10):4595-601.

- [23] Zhang T, Guan M, Jin HY, Lu Y. Reversal of multidrug resistance by small interfering double-stranded RNAs in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005; 97(2):501-7.
- [24] Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Ishiwata I, Inoue S, Takayama M, et al. A novel amplification at 17q21-23 in ovarian cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 172-177.
- [25] Kudoh K, Takano M, Koshikawa T, Hirai M, Yoshida S, Mano Y et al. Gains of 1q21-q22 and 13q12-q14 are potential indicators for resistance to cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5(9):2526-31.
- [26] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455(2-3):301-13.
- [27] Wesseling J, van der-Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell* 1996, 7(4):565-77.
- [28] Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 1997 272(19):12492-4.
- [29] ACC – Atlas of chromosomes in cancer – Accessed in June 2005. <<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/index.html>>
- [30] Dressman MA, Baras A, Malinowski R, Alvis LB, Kwon I, Walz TM, et al. Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63(9):2194-9.
- [31] CGAP – The Cancer Genome Anatomy Project – Accessed in June 2005 <<http://cgap.nci.nih.gov/Genes/GeneFinder>>
- [32] Pang E, Hu Y, Chan KY, Lai PB, Squire JA, Macgregor PF, et al. Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 2005; 85(5):664-74.

- [33] Bani MR, Nicoletti MI, Alkharouf NW, Ghilardi C, Petersen D, Erba E, Sausville EA, Liu ET, Giavazzi R. Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(2):111-21.
- [34] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905):707-12.
- [35] Heinrich JK, Bottcher-Luiz F, Andrade LL, Davidson S, Bonds L, Stephens J, et al. HER-2 and cancer antigen 125 evaluation in ovarian borderline tumors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(6):1078-85.
- [36] Marques FR, Fonseca-Carvasan GA, De Angelo Andrade LA, Bottcher-Luiz F. Immunohistochemical patterns for alpha- and beta-catenin, E- and N-cadherin expression in ovarian epithelial tumors. *Gynecol Oncol* 2004 94(1):16-24.

Table 1: Summary of patient information and CGH findings.

ID	RES	HT	Age	F.Up	ALT	AMPLIFICATIONS	DELETIONS
1	YES	S	62	<6 (*)	16	1q21-q22, 3q23-q25, 3q24-qter, 17q12-qter, 20, Xp12	2q32-qter, 16p
2	YES	S	66	<6(*)	5	1q21-q24, 8p12-pter,	1p
3	YES	S	72	<6(*)	3	1q41-qter, 11p12-p14, 17q12-qter	
5	YES	S	60	<6(*)	5	3q24-qter, 6p12-22	
8	YES	S	45	<6(*)	8	1q21-q22, 9q23-qter, 17q21-22	7
9	YES	S	66	<6(*)	6	7p22-pter, 17	13q21-qter
11	YES	S	62	11 (PD)	12	6q24-qter, 11p	
16	YES	S	55	11(PD)	8	1p12, 13q21-22	2q23-qter, 3p, 6p22-pter, Xp12-q23
17	YES	S	48	<6(*)	7	1q24-q32	10q
18	YES	S	32	<6(*)	18	3q21-qter, 8q21-qter, 17q21-q22, 19q, 22, Xp12-pter	
19	YES	S	61	<6(*)	3	17q12-22, 11p12-q22	X
23	YES	S	63	<6(*)	7	1q32-qter, 8q, 16q12, 20p12-q21	7q21-qter
13	YES	M	71	9 (PD)	7	1q21-q24, 2q24-q26, 6q22, 8q21-qter, 17	10q12
14	YES	M	68	15 (PD)	9	1q21-q22, 6p12-pter	
15	YES	M	57	<6(*)	3	17q, Xq24-qter	20q
20	YES	M	62	<6(*)	8	5p23-pter, 6q22-qter	
7	NO	S	70	12 (DF)	3	2p12-p14	
6	NO	S	55	13(DF)	4	3q32, 8q, 13q22-qter	1q31-q41, 8p12-pter
4	NO	S	58	24 (DF)	6	4q12	3q24-26
21	NO	S	44	22 (DF)	3	3q, 16q12-qter	3q
22	NO	S	59	17 (DF)	5	17q21-qter, 20p12	
24	NO	S	29	15 (DF)	8	1q21-q23, 2p22-pter, 8q12-qter, 12p22, Xq21-qter	
12	NO	S	67	15 (DF)	2	16q	15q22-qter
10	NO	M	52	16 (DF)	9	3q22-q24, 16q21-qter, 17p12-pter	1p22-pter

ID: Identification / **RES:** resistant phenotype / **HT:** histological type (S: Serous / M: Mucinous) / **F.Up:** Follow Up in months (* : died / PD: progressive disease / DF: disease free) **ALT:** number of chromosomic alterations.

Graphic 1: Patients (X) and chromosomal distribution (Y) of abnormalities

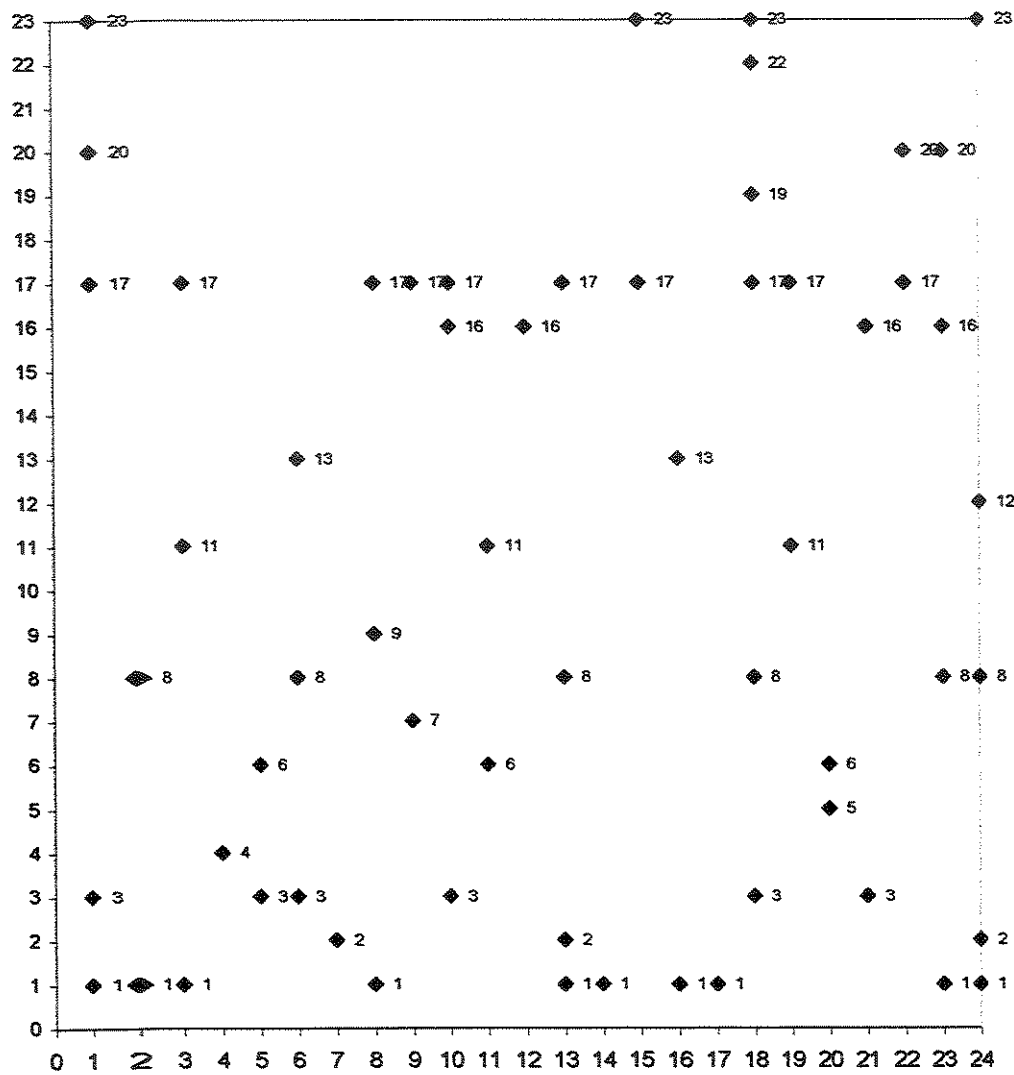


Figure 1: Diagram of amplification patterns for chromosome 17.

Green lines represent findings in each patient. Black line represents literature findings.

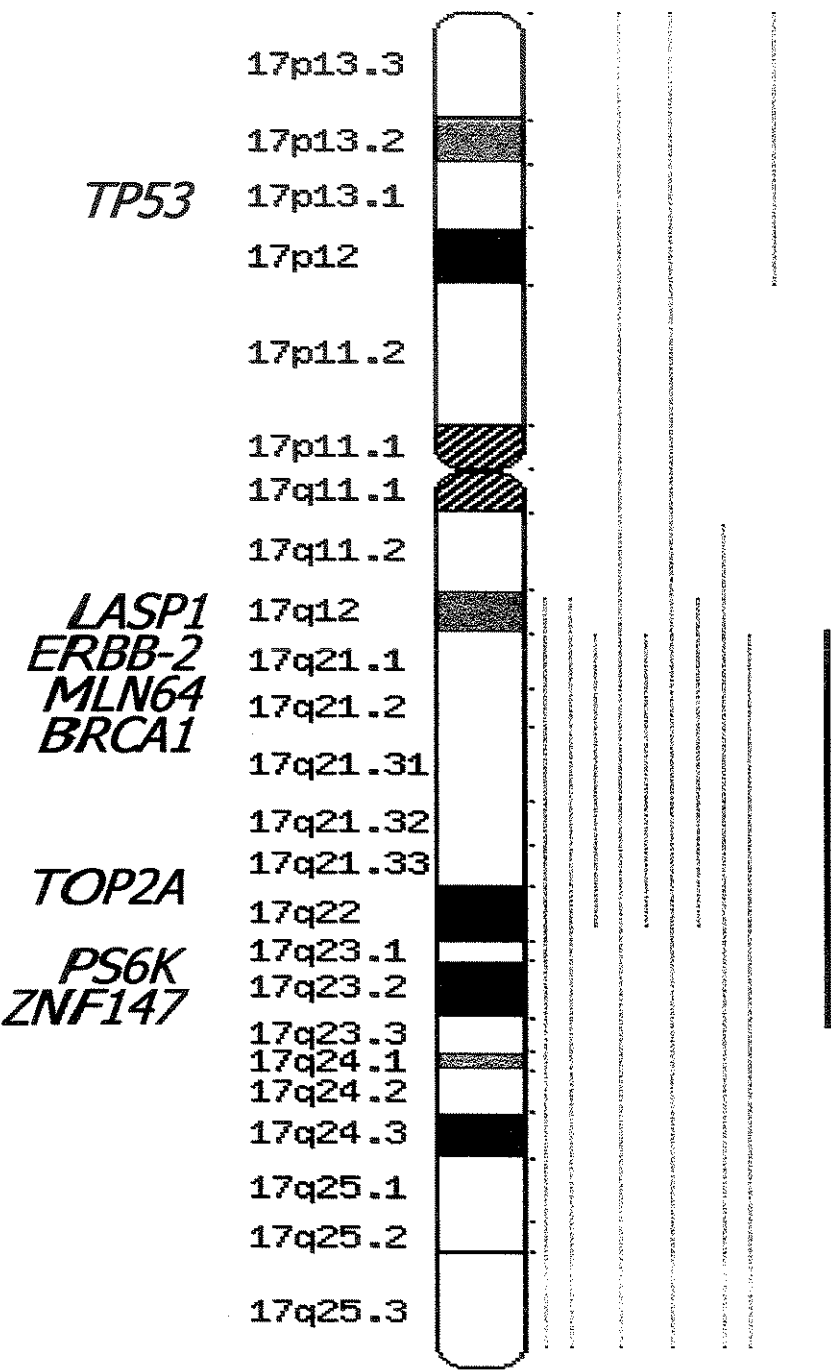
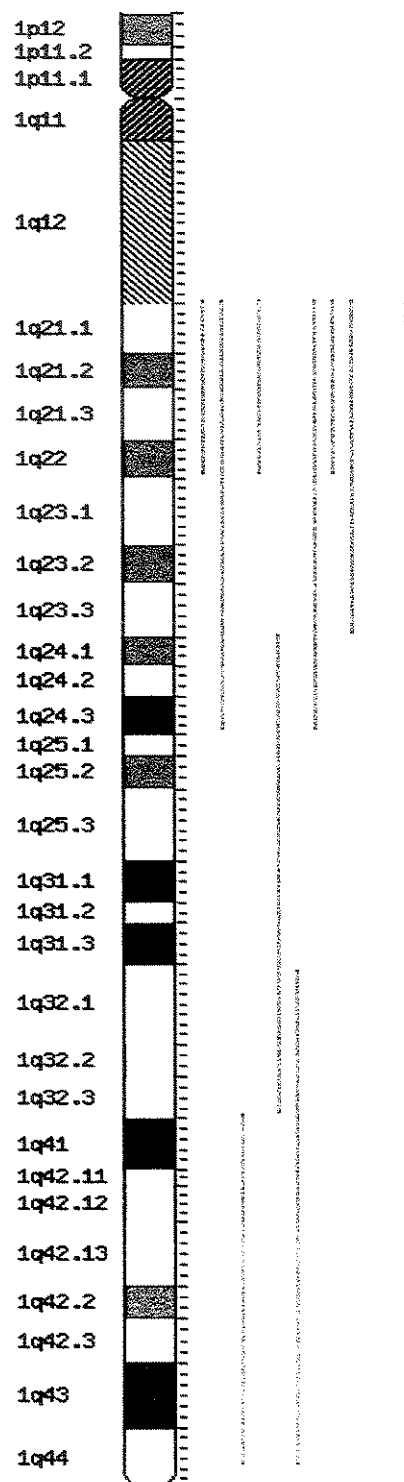


Figure 2: Diagram of amplification patterns for 1q.

Green lines represent findings in each patient. Black line represents literature findings.

ARNT
MUC1



ARTICLE PRÉCIS:

Regions at 1q and 17q are shown to be amplified in 88% of our platinum resistant patients and might be used as biomarkers to predict chemoresponse.

DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos, a pesquisa de marcadores tumorais tem sido uma das prioridades da Oncologia. Para vários tipos de tumores, a utilização de marcadores é freqüente, tanto no auxílio ao diagnóstico por imagem, quanto na abordagem terapêutica. Apoiado pelos achados das áreas genômica e proteômica, o Herceptin® (trastuzumab) constitui um dos mais efetivos exemplos nesse sentido. Esse quimioterápico é empregado quando ocorre amplificação ou hiper-expressão do gene ERBB-2, detectadas através de ensaios imuno-histoquímicos ou, preferencialmente, por FISH. Outro medicamento que revolucionou o tratamento quimioterápico, só que desta vez nos casos de leucemia mieloide crônica (LMC), é o imatinib ou STI-571, conhecido como Glivec®. Trata-se de uma droga administrada por via oral que inibe seletivamente o produto gênico da translocação entre os cromossomos 9 e 22 e produz a proteína quimérica bcr-abl, responsável pela LMC. Pacientes tratados com esta droga têm apresentado remissões hematológica e citogenética completas, além de apresentarem efeitos tóxicos adversos mínimos. Graças aos resultados positivos no tratamento da LMC e devido à sua baixa toxicidade, o Glivec® tem sido avaliado em outros tipos de tumores, como o tumor gastro-intestinal metastático que apresenta mutações em genes que codificam outros receptores do tipo tirosina-quinase (ROSS, 2004).

No câncer de ovário, pouco se acrescentou ao tratamento quimioterápico convencional. Não houve grandes modificações do tratamento na última década, exceção feita à inclusão do paclitaxel nos regimes quimioterápicos para tumores refratários ao tratamento de primeira linha. Ainda assim, e apesar de sua eficácia, tratamentos combinados de platina e paclitaxel não são amplamente disponibilizados nos serviços públicos de várias nações, incluindo o Brasil, em razão de seu alto custo financeiro.

A despeito da combinação a outras drogas, a platina torna-se a base para o tratamento quimioterápico dos cânceres de ovário. O entendimento dos fatores e genes que desencadeiam o processo de resistência a esse agente torna-se de vital importância, não apenas por ser esse o tratamento padronizado, mas também pela capacidade de deflagrar frequentemente o fenômeno de quimio-resistência, encontrado nos carcinomas ovarianos. Na prática, a grande maioria dos oncologistas ainda utiliza-se de recursos como a

combinação de drogas com diferentes alvos e o aumento da dose dos quimioterápicos, para alcançarem resultados satisfatórios (FRASER *et al.*, 2003).

Genes e proteínas que possam ser especificamente relacionados à resposta à quimioterapia à base de platina vêm sendo propostos por diversos grupos. Entre eles, anomalias nos genes *ERBB-2*, *TP53*, *BAX*, *BCL-2*, *BRCA-1*, *RAS*, *MAPK*, *GADD5A*, no microsatélite D6S81 e em proteínas como xist, muc1, ddh e, ainda, nas gsts (HUANG *et al.*, 2002, MAKHIJA *et al.*, 2002, SELVANAYAGAM *et al.*, 2004, TAKANO *et al.*, 2004, CHEN *et al.*, 2005, HARTMANN *et al.*, 2005). Entretanto, o caráter definitivo e a maneira como cada um deles contribui para o fenótipo de químio-resistência ainda precisa ser melhor elucidado.

Na linha da citogenética molecular e resistência à platina, um grupo em especial vem se destacando. Em um primeiro momento, o grupo propôs possíveis regiões cromossômicas que poderiam estar envolvidas no fenótipo de resistência à platina através de padrões de ganhos e perdas por CGH, em uma abordagem bastante semelhante à realizada neste estudo. O grupo descreveu ganhos importantes em 1q21-q22, 6p, 6q21-q25, 7q, 13q12-q14, 17q e perdas em 7q21-q36, 10q12-q15, 15q, 17p, 18q, 21q (TAKANO *et al.*, 2001).

Recentemente, o grupo publicou um segundo trabalho em que, baseado nos achados do primeiro estudo, investigou sequências específicas de DNA localizadas em 1q21-q22 e 13q12-q14, por PCR “*real-time*”. Apontaram que uma sequência em especial estaria amplificada em pacientes resistentes à platina. A região, em 1q21-q22, abriga o gene *MUC1* e estudos utilizando imuno-histoquímica comprovaram que a proteína muc1 encontrava-se super-expressa nessas pacientes resistentes. De acordo com nossa pesquisa bibliográfica, esse é o único estudo que correlaciona positiva e estatisticamente um marcador citogenético a um fenótipo de interesse. No caso, o fenótipo de resistência à platina (TAKANO *et al.*, 2004). Em nosso projeto, a técnica de CGH permitiu-nos confirmar a amplificação observada anteriormente por esse grupo. Em nossa amostra, observamos alterações no braço longo do cromossomo 1 em 10 das 24 pacientes analisadas. Interessantemente, 88% dessas pacientes apresentaram resistência à platina.

Da mesma forma, outra alteração recorrente observada nas pacientes resistentes ao tratamento quimioterápico foi o ganho da região 17q e, por vezes, do cromossomo 17 inteiro, sugerindo fortemente a relação entre esse cromossomo e a manifestação do fenótipo de resistência. Localizados nesse cromossomo, o *TP53* e o *ERBB-2* já foram citados em trabalhos anteriores como possivelmente ligados a um prognóstico ruim no câncer de ovário (NIELSEN *et al.*, 2004) e a deleção do gene *BRCA1*, detectada por FISH, foi associada à baixa idade ao diagnóstico do tumor e, possivelmente, menor sobrevida (KATO *et al.*, 2004). A região 17q21-23 foi apontada, em 2001, pelo grupo de Watanabe e colaboradores, como possivelmente envolvida na tumorigênese do câncer de ovário. Além da proximidade aos genes acima citados, essa região abrigaria os genes *PS6K* e *ZNF147*. O gene *PS6K*, localizado em 17q23, codifica uma proteína-quinase que participa na regulação do ciclo celular, especificamente na progressão de G1 para a fase S e também estaria amplificado em cânceres de mama com amplificação em 17q22-24. Na mesma região, encontra-se o gene *ZNF147* que codifica a proteína *efp* (*estrogen responsive finger protein*). Essa proteína pertence a uma família de proteínas que funcionam como fatores de transcrição, portanto mediadores e amplificadores da ação do estrogênio. Esses dados, contudo, não foram ainda confirmados em ensaios imuno-histoquímicos. Apesar disso, os resultados obtidos em nosso estudo confirmam, à semelhança do que foi postulado por WATANABE *et al.* (2001), que o ganho em regiões específicas do cromossomo 17, quer representadas por pequenos segmentos, quer pela aquisição de aneuploidia, têm importante significado clínico nos cânceres de mama e ovário (WATANABE *et al.*, 2001).

Além das amplificações nos cromossomos 1 e 17, outros cromossomos que demonstraram frequência de ganhos em um número significativo, mas não na maioria dos casos, foram os cromossomos 3 (6 casos) e 8 (6 casos), ambos no braço longo. Genes importantes localizados nesses cromossomos e com possível efeito na tumorigênese e/ou progressão dos carcinomas ovarianos seriam o gene *PIK3CA*, em 3q26 e o *C-MYC* em 8q24 (SONODA *et al.*, 1997; SHAYESTEH *et al.*, 1999).

De uma forma oposta, a frequente amplificação em 20q13, observada em outros trabalhos, não foi observada por nosso grupo. Ao contrário, observamos amplificações em 20p e apenas um caso de aneuploidia total do cromossomo 20 (IWABUCHI *et al.*, 1995,

WANG, 2002). A análise comparativa de perfis de CGH em tumores primários e seus respectivos sítios de recidiva demonstra que ganhos em 20q12q13 aparecem somente nos sítios de recidiva, sugerindo que esta anomalia deve estar associada à capacidade de recorrência do tumor (HU *et al.*, 2003). Ganhos nos cromossomos 19 e 20 também estão associados à recorrência de tumores da tireóide (WADA *et al.*, 2002). O fato de termos analisado apenas tumores primários justificaria não termos encontrado ganho nessa região, reforçando a hipótese de que ganho em 20q seria um evento tardio da carcinogênese e não relacionado à resistência à platina. Também não verificamos alterações na região 7q11, onde localiza-se o gene MDR1, sugerindo que, no câncer de ovário, o fenótipo de resistência não deve estar relacionado à via da glicoproteína P, tanto em níveis pré como pós transcricionais (OZALP *et al.*, 2002). Entretanto, em cultivo celular, pode-se demonstrar que RNAs de interferência (siRNAs) reverteram o fenótipo de resistência, inibindo a expressão do gene MDR (ZHANG *et al.*, 2005).

Comparando nossos resultados com os publicados anteriormente, podemos perceber que além das relações entre o fenótipo de resistência e marcadores citogenéticos, e tomando os resultados obtidos em estudos de caracterização não relacionados a um fenótipo em especial, nossos resultados corroboram com aqueles apresentados por Watanabe e colaboradores (2001), Kiechle e colaboradores (2001) e por Hu e colaboradores (2003), que descreveram alterações em 1q, 3q e 8q. Apoiados por esses três trabalhos e em nossos achados, poderíamos confirmar a importância do estudo mais aprofundado de genes em 1q e 17q como potenciais biomarcadores para resistência à platina, especificamente, expandindo o estudo para além da região de 1q21-q22, proposta anteriormente (TAKANO *et al.*, 2004), uma vez que observamos alterações em 1q12 e em 1q como um todo. Por outro lado, amplificações em 3q e 8q parecem estar envolvidas apenas na tumorigênese e/ou progressão do câncer de ovário, como verificado por outros autores, e não ao fenótipo de resistência em si (BAYANI *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2003).

O número de pacientes investigadas neste trabalho foi um fator limitante para a análise estatística. Os trabalhos puramente dedicados a caracterizações citogenéticas por CGH não empregam análises estatísticas, a não ser aquela contida no software para análise

das imagens, para a definição das razões de hibridização para ganhos e perdas, uma vez que é uma técnica qualitativa e descritiva.

Por outro lado, a aplicabilidade clínica da técnica exige que resultados qualitativos sejam testados em sua co-relação a outros fatores como sobrevivência geral, sobrevida livre da doença, tipo histológico, grau de diferenciação, idade, fatores hormonais, resistência ou não ao tratamento quimioterápico, entre outros.

O nosso trabalho preocupou-se em ser descritivo, caracterizando pacientes deste hospital universitário e que apresentaram resistência à platina. Pacientes não resistentes foram incluídas na amostra. O pareamento ou equilíbrio entre o número de pacientes resistentes e não resistentes não nos foi possível por condições restritas de orçamento, além de limitação de material de qualidade para as hibridizações. O grupo de pacientes estudadas era homogêneo, incluindo, apenas, pacientes portadoras de carcinomas do tipo seroso e mucinoso que foram submetidas ao mesmo esquema quimioterápico após a cirurgia. Basicamente, platina conjugada à ciclofosfamida e, em alguns casos, paclitaxel. Em comum, a platina. A ciclofosfamida foi utilizada em todos os esquemas quimioterápicos, enquanto o paclitaxel apenas em alguns. Acreditamos que o emprego ou não do paclitaxel não deva ter alterado o fenótipo de resistência à platina, uma vez que os mecanismos de resistência dessas duas drogas são totalmente diferentes, sendo o alvo do paclitaxel as moléculas de tubulina das fibras do fuso, na divisão celular, enquanto o alvo da cisplatina é basicamente o DNA (DUAN *et al.*, 2005). Da mesma forma que a utilização do paclitaxel nos esquemas quimioterápicos dessas pacientes não deve ter influenciado nos resultados de nossa amostra, a utilização da carboplatina ou da oxaliplatina no lugar da cisplatina é indiferente, uma vez que o mecanismo de ação destas drogas é idêntico, sendo a única diferença entre elas a composição de suas fórmulas moleculares, o que não interferiria em sua capacidade de ligação ao DNA (SIDDIK, 2003). O fenótipo de resistência à ciclofosfamida é raro, não havendo descrições na literatura sobre a sua utilização isolada enquanto agente quimioterápico. Apesar de também ser classificada como um agente alquilante, cujo alvo principal é o DNA, como a platina, pacientes resistentes à platina não apresentam resistência cruzada à ciclofosfamida e podem beneficiar-se de terapia de

segunda linha à base de ciclofosfamida ou de seu análogo, a ifosfamida (FULFATO *et al.*, 2003; LISSONI *et al.*, 2003).

O projeto passou por diversas modificações ao longo dos últimos 4 anos. Após a aprovação da verba de pesquisa na FAPESP, foram necessários 27 meses para a padronização da técnica de CGH. Protocolos de marcação direta utilizando *kits* comerciais das empresa *Vysis* e *QbioGene*, para marcação não-enzimática através do sistema ULS, (*Universal Linkage System*) foram testados (ALERS *et al.*, 1999; VAN GIJLSWIJK *et al.*, 2001). Nesse último, a marcação foi bem sucedida; a qualidade da hibridização, ruim.

Em uma terceira e final tentativa, decidimos pela utilização da marcação indireta, largamente utilizada por outros grupos (KALLIONIEMI *et al.*, 1992; LUK *et al.*, 2001). A marcação indireta demonstrou boa qualidade de hibridização em nosso trabalho, e em trabalhos anteriores publicados. No entanto, é também conhecida pelo extenso e laborioso protocolo (apêndice).

Todos esses problemas, com relação à escolha do melhor protocolo para marcação do DNA a ser utilizado nas hibridizações, fizeram com que empreendêssemos muito tempo e, obviamente, recursos financeiros na padronização da técnica, em detrimento da análise de um número maior de casos. Vale ressaltar, no entanto, que o número de 24 tumores analisados não está aquém do número analisado por outros pesquisadores, em protocolos semelhantes, havendo trabalhos consistentes publicados com apenas 3 casos (ISRAELI *et al.*, 2004), 8 casos (LUK *et al.*, 2001), 20 casos (HU *et al.*, 2003), 22 casos (MAKHIJA *et al.*, 2003) e 26 casos (SCHRAMML *et al.*, 2003).

De uma forma geral, avaliamos que a realização deste projeto foi um grande desafio e, por outro lado, uma conquista para o nosso grupo de pesquisa. As dificuldades financeiras, oriundas da necessidade de novos reagentes para a padronização da marcação do DNA, impediram a análise de uma amostra maior e pareada. Por outro lado, é o primeiro estudo de um grupo brasileiro, avaliando uma amostra brasileira, desenvolvendo essa técnica em carcinomas de ovário, não apenas procurando caracterizar anomalias citogenéticas oriundas do carcinoma de ovário mas, sim, procurando indicar tendências e/ou relações dessas a um fenótipo de interesse.

A contribuição deste estudo está na confirmação da amplificação de 1q e 17q e sua possível ligação ao fenótipo de resistência. Adicionalmente, foram lançadas bases para estudos futuros, utilizando aCGH na confirmação das sequências e FISH para a validação destas, em um grande número de pacientes o que, à propósito, é a intenção do grupo.

Na continuação deste projeto, o objetivo será analisar a amplificação dessas regiões em um grupo ainda mais homogêneo de pacientes, cujos critérios de inclusão sejam: carcinoma ovariano do tipo histológico seroso, estadiamento cirúrgico macroscópico FIGO III, com níveis de CA125 elevados no pré-operatório e que tenham sido submetidas à cirurgia cito-redutora. O acompanhamento das pacientes e a avaliação do fenótipo de resistência à quimioterapia à base de platina seria realizado pelas dosagens de CA125 e acompanhamento dos sintomas clínicos. Assim como foi realizado no presente estudo, a verificação da ocorrência do fenótipo de resistência à platina nas pacientes seria pela avaliação clínica classificando pacientes resistentes como as que apresentaram qualquer tipo de atividade tumoral, em até 6 meses, avaliada por aumento nos níveis de CA125, presença de ascite e outros sintomas clínicos, como o critério proposto por Blackledge (BLACKLEDGE *et al.*, 1989).

A técnica de CGH tem proposto, ao longo dos anos, vários alvos e as bases para os estudos de microgenômica atuais não só no câncer de ovário, mas em praticamente todos os outros tipos de cânceres. Estudos posteriores complementares ao nosso, com a análise mais aprofundada dos marcadores propostos e sua validação em um grande número de pacientes, poderão contribuir para que, no futuro, com certeza, tenhamos eficientes marcadores prognósticos e de resposta ao tratamento, transformando; definitivamente, o panorama anacrônico atual do tratamento do câncer de ovário.

CONCLUSÕES

1. As ampliações de regiões cromossômicas predominaram sobre as deleções sugerindo que, no câncer de ovário, a via de ativação oncogênica – em contrapartida da via supressora – atua fortemente nos processos de progressão da doença. Os padrões mais frequentes observados foram ampliações nas regiões 1q, 3q, 8q e 17q.
2. Amplificações em 1q e 17q foram as mais frequentes nas pacientes resistentes à platina. As pacientes que apresentaram os maiores números de alterações, detectadas pela CGH, eram refratárias ao tratamento quimioterápico e demonstraram um prognóstico reservado.
3. Amplificações em 1q21-q22 e 17q12-q22 foram eventos frequentes em nossa amostra e nos trabalhos publicados anteriormente, sugerindo que amplificação em genes localizados nessas regiões podem atuar, isolada ou sinergisticamente, para o aparecimento e manutenção do fenótipo de resistência à platina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGUILA, J. F.; RAMOS, O. C.; ÁLVAREZ, I. V.; VÁZQUEZ, R. P. Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. **Cubana Oncol** 14(2): 111-20, 1998.

ALERS, J.C.; ROCHAT, J.; KRIJTENBURG, P.J.; VAN DEKKEN, H.; RAAP, A.K.; ROSENBERG, C. Universal linkage system: an improved method for labeling archival DNA for comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer** 25(3):301-5, 1999.

BAYANI, J.; BRENTON, J.D.; MACGREGOR, P.F.; BEHESHTI, B.; ALBERT, M.; NALLAINATHAN, D.; KARASKOVA, J.; ROSEN, B.; MURPHY, J.; LAFRAMBOISE, S.; ZANKE, B.; SQUIRE, J.A. Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays. **Cancer Res** 62(12):3466-76, 2002.

BELL, D. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. **Modern Pathology** 18:S19-S32, 2005.

BISHOP, J. M.; WEINBERG, R. A. Molecular Oncology. **Scientific American**: 124: 151-6, 1996.

BLACKLEDGE, G.; LAWTON, F.; REDMAN, C.; KELLY, K. Response of patients in phase II studies of chemotherapy in ovarian cancer: implications for patient treatment and the design of phase II trials. **Br J Cancer**. 59(4): 650-3, 1989.

BOENTE, M. P.; CHI, D. S.; HOSKINS, W. J. The role of surgery in the management of ovarian cancer: primary and interval cytoreductive surgery. **Seminars in Oncology** 25(3): 326-34, 1998.

BONASSA, E. Enfermagem em Quimioterapia. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Atheneu Ed., 1998.

CHEN, Y.; YUAN, C.; CHOW, K.; WANG, P.; LAI, C.; YEN, M.; WANG, L. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase is associated with cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer patients. **Gynecol Oncol** 97: 110-7, 2005.

- CHUNG, Y.L.; SHEU, M.L.; YANG, S.C.; LIN, C.H.; YEN, S.H. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. **Int J Cancer** 97(3):306-12, 2002.
- DALY, M.; OBRAMS, G.I. Epidemiology and Risk Assesment for Ovarian Cancer. **Seminars in Oncology** 25(3): 255-64, 1998.
- DAMIA, G.; FILIBERTI, L.; VIKHANSKAVA, F.; CARRASSA, L.; TAYA, Y.; D'INCALCI, M.; BROGGINI, M. Cisplatinum and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. **Neoplasia** 3(1):10-6, 2001.
- DEPPE, G.; BAUMANN, P. Advances in ovarian cancer chemotherapy **Curr Opin Oncol** 12(5):481-91, 2000.
- DENT, P.; GRANT, S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. **Clin Cancer Res** 7(4):775-83, 2001.
- DRESSMAN, MA.; BARAS, A.; MALINOWSKI, R.; ALVIS, LB.; KWON, I.; WALZ, TM.; POLYMERPOULOS, MH. Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer. **Cancer Res** 63(9):2194-9, 2003.
- DUAN, Z.; LAMENDOLA, D.E.; DUAN, Y.; YUSUF, R.Z.; SEIDEN, M.V. Description of paclitaxel resistance-associated genes in ovarian and breast cancer cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol** 55(3):277-85, 2005.
- EASTMAN, A. Glutathione-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes. **Biochem Pharmacol** 36(23):4177-8, 1987.
- FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev Bras Hemat Hemot** 24: 85-9, 2002.
- FOJO, A. T.; UEDA, K.; SLAMON, D. J.; POPLACK, D. G. Expression of a multidrug resistance gene in humans tumors and tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 265-9, 1987.

FRANCO, V.C.O. A resistência à quimioterapia no câncer ginecológico e de mama – uma avaliação qualitativa do momento atual - Rio Claro, 2005. (Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação – UNESP - Universidade Paulista).

FRASER, M.; LEUNG, B.; JAHANI-ASL, A.; YAN, X.; THOMPSON, W.E.; TSANG, B.K. Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. **Reprod Biol Endocrinol** 1(1):66, 2003.

FULFARO, F.; VALERIO, M.R.; BADALAMENTI, G.; GEBBIA, N.; RUSSO, A. Antitumor drug combinations with ifosfamide: an update. **Oncology** 65 Suppl 2:21-30, 2003.

GIGLIO, A. Resistência à quimioterapia: uma revisão para o oncologista. Revista da Sociedade Brasileira de Câncer – Nº 14, 2001.

GÓMEZ, M. J. R.; RODRIGUEZ, A. S.; MORILLO, M. M. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. **An Med Interna** 19(9): 477- 85, 2002.

GUAN, X.Y.; FUNG, J.M.; MA, N.F. LAU, S.H., TAI, L.S.; XIE, D.; ZHANG, Y.; HU, L., WU, Q.L.; FANG, Y.; SHAM, J.S. Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer. **Cancer Res** 64(12):4197-200, 2004.

HALBE, H. W. Tratado de Ginecologia. 3ª edição – 3º volume. São Paulo. Editora Rocca, 2000. pp. 2043 – 89.

HAUPTMANN, S.; DENKERT, C.; KOCH, I.; PETERSEN, S.; SCHLUNS, K.; RELES, A.; DIETEL, M.; PETERSEN, I. Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. **Hum Pathol** 33(6):632-41, 2002.

HARTMANN, L.C.; LU, K.H.; LINETTE, G.P.; CLIBY, W.A.; KALLI, K.R.; GERSHENSON, D.; BAST, R.C.; STEC, J.; IARTCHOUK, N.; SMITH, D.I.; ROSS, J.S.; HOERSCH, S.; SHRIDHAR, V.; LILLIE, J.; KAUFMANN, S.H.; CLARK, E.A.; DAMOKOSH, A.I. Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. **Clin Cancer Res** 11: 2149-55, 2005.

HEINRICH, J. K. R. CA125 e HER-2/neu em tumores de ovário do tipo borderline – estudo imunohistoquímico e por hibridização in situ por fluorescência (FISH). Campinas, 2001. (Dissertação de Mestrado – UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas).

HERSHBERGER, P.A.; MCGUIRE, T.F.; YU, W.D.; ZUHOWSKI, E.G.; SCHELLENS, J.H.; EGORIN, M.J.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. **Mol Cancer Ther** 1(10):821-9, 2002.

HU, J.; KHANNA, V.; JONES, M.W.; SURTI, U. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas: comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. **Gynecol Oncol** 89(3):369-75, 2003.

HUANG, K.; RAO, P.H.; LAU, C.C.; HEARD, E.; NG, S.; BROWN, C.; MOK, S.C.; BERKOWITZ, R.S.; NG, S. Relationship of XIST expression and responses of ovarian cancer to chemotherapy. **Mol Cancer Therap** 1: 769-76, 2002.

ISHKANIAN, A.; MALLOFF, C.A.; WATSON, S.K.; deLEEuw, R.; CHILB.; COE, B.P.; SNIJDERS, A.; ALBERTSON, D.G.; PINKEL, D.; MARRA, M.A.; LING, V.; MACAULAY, C.; LAM, W.L. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. **Nat Genet** 36(3): 299 - 303, 2004.

ISRAELI, O.; GOTLIEB, W.H.; FRIEDMAN, E.; KORACH, J.; FRIEDMAN, E.; GOLDMAN, B.; ZELTSER, A.; BEN-BARUCH, G.; RIENSTEIN, S.; AVIRAM-GOLDRING, A. Genomic Analyses of primary and metastatic serous epithelial ovarian cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 154:16-21, 2004.

IWABUCHI, H.; SAKAMOTO, M.; SAKUNAGA, H.; MA, Y.Y.; CARCANGIU, M.L.; PINKEL, D.; YANG-FENG, T.L.; GRAY, J.W. Genetic analysis of benign, low-grade and high-grade ovarian tumors. **Cancer Res** 55: 1672-80, 1995.

JACOBSEN, A.; ARNOLD, N.; WEIMER, J.; KIECHLE, M. Comparison of comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization in ovarian carcinomas: possibilities and limitations of both techniques. **Cancer Genet Cytogenet** 122(1):7-12, 2000.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J.W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science** 258(5083):818-21, 1992.

KATO, H.; ARAKAWA, A.; SUZUMORI, K.; KATAOKA, N.; YOUNG, S.R. FISH analysis of BRCA1 copy number in paraffin-embedded ovarian cancer tissue samples. **Exp Mol Pathol** 76(2):138-42, 2004.

KIECHLE, M.; JACOBSEN, A.; SCHWARZ-BOEGER, U.; HEDDERICH, J.; PFISTERER, J.; ARNOLD, N. Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. **Cancer** 91(3):534-40, 2001.

KUANG, J.; HE, G.; HUANG, Z.; KHOKHAR, A.R.; SIDDIK, Z.H. Bimodal effects of 1R,2R-diaminocyclohexane (trans-diacetato) (dichloro) platinum(IV) on cell cycle checkpoints. **Clin Cancer Res** 7(11):3629-39, 2001.

KRUH, G. D. Introduction to resistance to anticancer drugs. **Oncogene** 22:7762-4, 2003.

LEGGE, F.; FERRANDINA, G.; SALUTARI, V.; SCAMBIA, G. Biological characterization of ovarian cancer: prognostic and therapeutic implications. **Ann Oncol** 16(4): 95-101, 2005.

LISSONI, A. A.; FELI, F.; ROSSI, R.; FRUSCIO, R.; VILLA, A.; ZANI, G. Ifosfamide in the treatment of malignant epithelial ovarian tumors. **Oncology** 65(2):59-62, 2003.

LUK, C.; TSAO, M.S.; BAYANI, J.; SHEPHERD, F.; SQUIRE, J.A. Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet.** 125(2): 87-99, 2001.

MAKHJIA, S.; SIT, A.; EDWARDS, R.; AUFMAN, K.; WEISS, H.; KANBOURSHAKIR, A.; GOODING, W.; D'ANGELO, G.; FERRELL, R.; RAJA, S.; GODFREY, T.E. Identification of genetic alterations related to chemoresistance in epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 90:3-9, 2003.

MCGUIRE, W. P.; OZOLS, R. F. Chemotherapy of advanced ovarian cancer. **Seminars in Oncology** 25(3): 340-8, 1998.

NIELSEN, J. S.; JAKOBSEN, E.; HOLUND, B.; BERTELSEN, K.; JAKOBSEN, A. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 14(6):1086-96, 2004.

OZALP, S.S.; YALCIN, O.T.; TANIR, M.; KABUKCUOGLU, S.; ETIZ, E. Multidrug resistance gene-1 (Pgp) expression in epithelial ovarian malignancies. **Eur J Gynecol Oncol** 23(4):337-40, 2002.

OZOLS, R.F. Ovarian cancer practice guidelines. **Oncology** 11:95-105, 1997.

PATAEL-KARASIK, Y.; DANIELY, M.; GOTLIEB, W. H.; BEN-BARUCH, G.; SCHIBY, J.; BARAKAI, G.; GOLDMAN, B.; AYIRAM, A.; FRIEDMAN, E. Comparative genomic hybridization in inherited and sporadic ovarian tumors in Israel. **Cancer Genet Cytogenet** 121(1):26-32, 2000.

PECORELLI, S.; BENEDET, J. L.; CREASMAN, W. T.; SHEPHERD, J. H. FIGO staging of gynecologic cancer. **Int J Gynecol Obstet** 65: 243-9, 1999.

PELENGARIS, S.; KHAN, M. The many faces of c-MYC. **Arch Biochem Biophys** 416: 129-136, 2003.

QUIRK, J.T.; NATARAJAN, N. Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999. **Gynecol Oncol**, 97(2):519-23, 2005.

RAO, P.H.; HARRIS, C.P.; YAN, L.U.X; LI, X.N.; MOK, S.C.; LAU, C.C. Multicolor spectral karyotyping of serous ovarian adenocarcinoma. **Genes Chrom Cancer** 33(2):123-32, 2002.

ROBBINS, S. R.; COTRAN, R. S. ; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 5ª edição - Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1996 . 1277p.

ROBERTS, J. J. E PERA-JR, J. J. Platinum, gold and other metal chemotherapeutic agents: chemistry and biochemistry – Washington, D.C. Editora Lippard, pp 3-25.

ROSENTHAL, A; JACOBS, I. Ovarian Cancer Screening. **Seminars in Oncology** 25(3): 315-25, 1998.

ROSS, J. S.; SCHENKEIN, D. P.; PIETRUSKO, R.; ROLFE, M.; LINETTE, G. P.; STEC, J.; STAGLIANO, N. E.; GINSBURG, G. S.; SYMMANS, W. F.; PUSZTAL, L.; HORTOBAGYI, G. N. Targeted therapies for cancer 2004. **Am J Clin Pathol** 122(4):598-609, 2004.

SCHRAML, P.; SCHWERDTFEGER, G.; BURKHALTER, F.; RAGGI, A.; SCHMIDT, D.; RUFFALO, T.; KING, W.; WILBER, K.; MIHATSCH, M. J.; MOCH, H. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. **Am J Pathol** 163(3): 985-92, 2003.

SCULLY, R.R.; World Health Organization classification and nomenclature of ovarian cancer. **Natl Cancer Inst Monogr** 42:5-7, 1975.

SELVANAYAGAM, Z. E.; CHEUNG, T. H.; WEI, N.; VITTAL, R.; LO, K. W. K.; YEO, W.; KITA, T.; RAVATN, R.; CHUNG, T. K. H.; WONG, Y. F.; CHIN, K. V. Prediction of chemotherapeutic response in ovarian cancer with DNA microarray expression profiling. **Cancer Genet Cytogenet** 154: 63-6, 2004.

SHAPIRO, G.I.; HARPER, J.W. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. **J Clin Invest** 104(12): 1645-53, 1999.

SHAYESTEH, L.; LU, Y.; KUO, W.L.; BALDOCCHI, R.; GODFREY, T.; COLLINS, C.; PINKEL, D.; POWELL, D.; MILLS, G.B.; GRAY, J.W. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. **Nat Genet** 21: 99-102, 1999.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene** 22: 7265-79, 2003.

SNIJERS, A. M.; NOWAK, N.; SEGRAVES, R.; BLACKWOOD, S.; BROWN, N.; CONROY, J.; HAMILTON, G.; HINDLE, A.K.; HUEY, B.; KIMURA, K.; LAW, S.; MYAMBO, K.; PALMER, J.; YLSTRA, B.; YUE, J. P.; GRAY, J.W.; JAIN, A.N.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D.G. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. **Nat Genet** 29(3):263-64, 2001.

SONODA, G.; PALAZZO, J.; DU MANOIR, S.; GODWIN, A.K.; FEDER, M.; YAKUSHIJ, M.; TESTA, J.R. Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24 and 20q13 in human ovarian carcinomas. **Genes Chromosom Cancer** 20: 320-8, 1997.

STAVROVSKAYA, A. A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry** 65(1):95-106, 2000.

SOOD, A.K.; BULLER, R.E. Drug resistance in ovarian cancer: from the laboratory to the clinic. **Obstet Gynecol** 92(2): 312-9, 1998.

TAKANO, M.; KUDO, K.; GOTO, T.; YAMAMOTO, K.; KITA, T.; KIKUCHI, Y. Analysis by comparative genomic hybridization of genes relating with cisplatin-resistance in ovarian cancer. **Hum Cell** 14(4):267-71, 2001.

TAKANO, M.; FUJII, K.; KITA, T.; KIKUCHI, Y.; UCHIDA, K. Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer. **Oncology Reports** 12: 1177-82, 2004.

TAPPER, J.; SARANTAUS, L.; VAHTERISTO, P.; NEVANLINNA, H.; HEMMER, S.; SEPPALA, M.; KNUUTILA, S.; BUTZOW, R. Genetic changes in inherited and sporadic ovarian carcinomas by comparative genomic hybridization: extensive similarity except for a difference at chromosome 2q24-q32. **Cancer Res** 58(13):2715-9, 1998.

TÊTTO, B.; BRISSON, J.; PLANTE, V.; BERNARD, P. p53 and c-erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer. **Mod Pathol** 11:823-30, 1998.

TIBILETTI, M.G.; BERNASCONI, B.; TABORELLI, M.; FACCO, C.; RIVA, C.; CAPELLA, C.; FRANCHI, M.; BINELLI, G.; ACQUATI, F.; TARAMELLI, R. Genetic and cytogenetic observations among different types of ovarian tumors are compatible with a progression model underlying ovarian tumorigenesis. **Cancer Genet Cytogenet** 15;146(2):145-53, 2003.

VAN GILSWIJK, R.P.; TALMAN, E.G.; JANSSEN, P.J.; SNOEIJERS, S.S.; KILLIAN, J.; TANKE, H.J.; HEETEBRIJ, R.J. Universal Linkage System: versatile nucleic acid labeling technique. **Expert Rev Mol Diagn** 1(1):81-91, 2001.

VIZZOTTO JUNIOR, A. O.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D. L. H.; CAMPOS, A. C. L. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **Bras Patol Med Lab** 39(2), 2003.

WADA, N.; DUH, Q.Y.; MIURA, D.; BRUNAUD, L.; WONG, M.G.; CLARK, O.H. Chromosomal aberrations by comparative genomic hybridization in hurthle cell thyroid carcinomas are associated with tumor recurrence. **J Clin Endocrinol Metab** 87(10):4595-601, 2002.

WATANABE, T.; IMOTO, I.; KOSUGI, Y.; ISHIWATA, I.; INOUE, S.; TAKAYAMA, M.; SATO, A. ; INAZAWA, J. A novel amplification at 17q21-23 in ovarian cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. **Gynecol Oncol** 81: 172-7, 2001.

WAGNER-SOUZA, K.; MELETTI-DE-OLIVEIRA, M. C.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, V. M. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia** 49(2):103-12, 2003.

WANG, X.; MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. **J Biol Chem** 275(50):39435-43, 2000.

WILLIAMS JR., J. A.; WANG, Z. R.; PARRISH, R. S.; HAZLETT, L. J.; SMITH, S. T. & YOUNG, S. R. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of HER-2/neu, c-myc and p53 in endometrial Cancer. **Exp Mol Pathol** 67: 135-43, 1999.

YOUNG, R. C.; PECORELLI, S. Management of Early Ovarian Cancer. **Seminars in Oncology** 25(3): 335-9, 1998.

ZHANG, T.; GUAN, M.; JIN, H.Y.; LU, Y. Reversal of multidrug resistance by small interfering double-stranded RNAs in ovarian cancer cells. **Gynecol Oncol** 97(2):501-7, 2005.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

INCA, 2005. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em junho de 2005.

UCB, 2004 – <http://www.ubc.com.br> – Acesso em 20/08/2004

APÊNDICES

DADOS DAS PACIENTES

N.	RES	ID	EST	QUIM	TH	F.Up (meses)	Status	ALT	AMPLIFICAÇÕES	DELEÇÕES
1	SIM	62	III	PC	S	<6	+	16	1q21-q22, 3q23-q25, 3q24-qter, 17q12-qter, 20, Xp12	2q32-qter, 16p
2	SIM	66	IV	PC	S	<6	+	5	1q21-q24, 8p12-pter,	1p
3	SIM	72	III	PC	S	<6	+	3	1q41-qter, 11p12-p14, 17q12-qter	
5	SIM	60	IV	PC	S	<6	+	5	3q24-qter, 6p12-22	
8	SIM	45	III	PC + Taxol	S	<6	+	8	1q21-q22, 9q23-qter, 17q21-22	7
9	SIM	66	IV	PC	S	<6	+	6	7p22-pter, 17	13q21-qter
11	SIM	62	III	PC + Taxol	S	II	DP	12	6q24-qter, 11p	
16	SIM	55	III	PC	S	II	DP	8	1p12, 13q21-22	2q23-qter, 3p, 6p22-pter, Xp12-q23
17	SIM	48	III	P + Taxol	S	<6	+	7	1q24-q32	10q
18	SIM	32	III	PC	S	<6	+	18	3q21-qter, 8q21-qter, 17q21-q22, 19q, 22, Xp12-pter	
19	SIM	61	IV	PC	S	<6	+	3	17q12-22, 11p12-q22	X
23	SIM	63	III	PC	S	<6	+	7	1q32-qter, 8q, 16q12, 20p12-q21	7q21-qter
13	SIM	71	III	PC + Taxol	M	9	DP	7	1q21-q24, 2q24-q26, 6q22, 8q21-qter, 17	10q12
14	SIM	68	III	PC	M	15	DP	9	1q21-q22, 6p12-pter	

15	SIM	57	IV	PC	M	<6	+	3	17q, Xq24-qter	20q
20	SIM	62	III	PC	M	<6	+	8	5p23-pter, 6q22-qter	
7	NÃO	70	III	PC	S	12	LD	3	2p12-p14	
6	NÃO	55	III	PC	S	13	LD	4	3q32, 8q, 13q22-qter	1q31-q41, 8p12-pter
4	NÃO	58	III	PC	S	24	LD	6	4q12	3q24-26
21	NÃO	44	II	P + Taxol	S	22	LD	3	3q, 16q12-qter	3q
22	NÃO	59	III	PC	S	17	LD	5	17q21-qter, 20p12	
24	NÃO	29	III	P+ Taxol	S	15	LD	8	1q21-q23, 2p22-pter, 8q12-qter, 12p22, Xq21-qter	
12	NÃO	67	III	PC	S	15	LD	2	16q	15q22-qter
10	NÃO	52	III	PC	M	16	LD	9	3q22-q24, 16q21-qter, 17p12-pter	1p22-pter

LEGENDA:

N – número de registro no projeto

RES – resistência à quimioterapia (SIM / NÃO)

ID – idade ao diagnóstico

ESTADIO – I a IV (FIGO)

QUIM – esquema quimioterápico – P: platina / C: ciclofosfamida / Taxol

TH – tipo histológico – S: seroso / M: mucoso

F.UP – Follow Up em meses

STATUS – status atual da paciente - + : morte / DP: doença progressiva / LD: livre da doença

ALT.: - número de alterações observadas

PROTOCOLOS

1. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO TUMORAL

1. Selecionar um pedaço pequeno do tumor, aproximadamente $0,5\text{cm}^3$ armazenado no freezer (-70°C) ou nitrogênio e colocá-lo sobre uma placa de petri esteril sobre gelo.
2. Com o auxílio de uma agulha hipodérmica e um bisturi (ambos estéreis), cortar o material em pedaços menores.
3. Lavar a placa de petri com o tampão de digestão e transferir o material para um tubo falcon. Completar o volume com o tampão de acordo com a quantidade de material (5 a 10 ml).
4. Incubar a 37°C por 12 – 18 horas no *shaker* (baixa rotação).
5. Adicionar igual volume de TE e depois, igual volume de fenol:clorofórmio. Misturar por inversão durante 5 minutos. Centrifugar a 2500 rpm por 15 minutos.
6. Repetir a etapa de fenol:clorofórmio e centrifugação.
7. Repetir a extração com fase polar separada até que não se observe mais resíduos protéicos entre as duas fases (geralmente duas repetições bastam).
8. Transferir a fase polar para um novo tubo e adicionar 1/10 volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100% gelado (o volume sempre em relação ao original). O DNA deve precipitar imediatamente.
9. Agitar lentamente, fazendo movimentos circulares para condensar o material.
10. Transferir todo o material para um tubo apropriado para centrifugação mais rápida. Centrifugar a 5.000-7.000 rpm por 10 minutos (alternativamente, utilizar uma haste para “pescar” o DNA).
11. Lavar com etanol 70% para retirar o excesso de sais e fenol, gotejando algumas gotículas sobre o DNA enrolado na haste.
12. Descartar o sobrenadante e deixar o DNA secar naturalmente.

13. Ressuspender o DNA em água milli-Q. Caso não se dissolva totalmente, colocar o material em banho-maria (65°C) por algumas horas.

14. Estocar a 4°C

Tampão de Digestão para tumores (TE)

100 mM NaCl

10 mM Tris HCl pH 8,0

25 mM EDTA pH 8,0

0,5% SDS

0,1 mg/ml Proteinase K

Usar 1,2 ml do tampão para cada 100 mg de tecido.

Para 1g. de tumor : 12 ml de tampão (volume final)

0,24 ml (240µl) NaCl 5M

0,06 ml (60µl) Tris-HCl pH 8,0 2M

0,6 ml (600µl) EDTA 0,5 M

0,3 ml (300µl) SDS 20%

0,6 ml (600µl) Proteinase K 2mg/ml

10,2 ml Água – q.s.p. 12 ml = volume final

Para cada 1,2 ml de tampão – 60 µl proteinase K 2 mg/ml

6 µl proteinase K 20 mg/ml

2. MARCAÇÃO DIRETA DO DNA PARA CGH

KIT “Nucleic Acid Labelling Systems” (Qbiogene), utilizado como instruído pelo fabricante. Resumidamente:

1. Adicionar 1U (2ul) do marcador ULS (tubo 1) a 1 ug de ácido nucléico
2. Ajustar o volume com solução de marcação (tubo 5) para 20 ul e homogeneizar
3. Incubar por 15 minutos a 65°C
4. Centrifugar para coletar o condensado
5. Purificar a sonda utilizando o kit GENCLEAN Turbo

3. MARCAÇÃO INDIRETA DO DNA PARA CGH

10X biotina dNTPs

REAGENTES	Volume (µl)	REAGENTES	Volume (µl)
		10 mM dATP	7.7
100 mg/ml BSA	1	10 mM dGTP	7.7
1 M b-mercaptoetanol	10	10 mM dCTP	7.7
1 M Tris	50	10 mM dTTP	5
1 M MgCl	5	10 mM dig-11-dUTP	25
0,4 mM biotin 14 dATP	25	H2O	23.9
10 mM dATP	1		
10 mM dCTP	2	Total do Volume	77
10 mM dGTP	2		
10 mM dTTP	2		
H2O (MilliQ autoclavada)	2		
Total do volume	100		
20 X digoxigenina dNTPs			

Tampão de Incubação – 10 X Digoxigenina

1 M Tris (pH 7,5)	5 ml
1 M MgCl	0,6 ml
1 M b-mercaptoetanol	1 ml
100 mg/ml BSA	10 µl
H ₂ O	3,5 ml

Total do Volume

1. Colocar todos os reagentes no gelo
2. Fazer os cálculos para marcar 2 µg de DNA (usar as concentrações iniciais)
3. Marcação com biotina (tumor)

Reagente	Volume (µl)
2 µg DNA	
10X biotina dNTPs	10
DNA polymerase I	2
H ₂ O	
Dnase I (diluição 2)	
	100

Diluição da Dnase I

I) 1 µl Dnase I solução estoque

99 µl tampão de diluição

(1/100)

II) 1 µl de I

99 µl tampão de diluição

(1/10.000)

Usar entre 5 – 10 µl da segunda diluição

4. Marcação com digoxigenina (normal)

REAGENTE	Volume (µl)
2 µg DNA	
10X dig incubation buffer	10
20X dig dNTPs	5
DNA polymerase I	2
H2O	(completar)
Dnase I (diluição 2)	
	100

Dnase I (Boehringer – Mannheim 104159)

0,5 mg/ml solução estoque

50% glicerol

50 mM Tris pH 7.8

5 mM MgCl

1 mM B-mercaptotetanol

100 µg/ml BSA

0,1 mM PMSF (opcional)

Dnase I (dilution buffer)

50 mM Tris pH 7.8

5 mM MgCl

1 mM b-mercaptotetanol

100 µg/ml BSA

DNA polimerase I (Boehringer – Mannheim 642720)

5 U/µl

5. Colocar a reação para incubar 16°C por 1:30 h

6. Durante o tempo de marcação preparar um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo

7. No final da marcação, colocar as amostras no gelo
8. Correr o gel com
10 µl DNA + 2 µl (6X loading buffer)
10 µl standard (de cada um 12,5 ng/µl, 25 ng/µl, 50 ng/µl)
10 µl λ Hind III marker + 2 µl (6 X LB)
9. Tirar uma foto do gel
10. Os fragmentos devem variar entre 5.000 pb e 2 kb. A concentração do DNA deve estar entre 200 e 300 ng (se a concentração inicial estiver correta)
11. Se o tamanho do DNA for adequado, parar a reação colocando 10 µl 300 mM EDTA. Se o tamanho da marcação for muito pequeno, retornar o DNA no banho 16°C adicionando mais Dnase I e DNA polimerase pelo tempo necessário.
12. Repetir o gel.
13. Tentar parear o DNA do tumor com o DNA normal de acordo com o tamanho e concentração. Se a concentração for difícil de determinar um segundo gel deve ser feito mudando a diluição (ex. se usou 10 µl para o 1º. gel, usar 7,5, 3 e 2 µl)
14. Se o DNA marcado só for ser usado no dia seguinte, um novo gel deve ser feito antes da utilização.

4. PROTOCOLO PARA HIBRIDIZAÇÃO

1. Após o procedimento de marcação, quantidades iguais de DNA tumoral e DNA normal são precipitados na presença de DNA humano Cot-1.
2. Ressuspender a sonda em solução de hibridização (50% formamida/2XSSC/dextran sulfato) e desnaturar.
3. Deixar a sonda reanelar por 1 hora a 37°C
4. Desidratar as lâminas com as metáfases alvo, digerir em proteinase K e desnaturar.

PRECIPITAÇÃO

15.0 ul (10ng/ul) de DNA tumoral

15.0 ul (10ng/ul) de DNA normal

10.0 ul DNA Cot-1 (1ug/ul)

Colocar a -70°C por 20 minutos ou -20°C *overnight*

Centrifugar a 14.000 rpm por 20 minutos

Remover etanol e lavar em 70% etanol

Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos, remover o etanol e deixar secar o pellet

Ressuspender em 30 ul de Solução de Hibridização

Desnaturar a sonda, por temperatura, por 10 minutos a 75°C

Deixar a 37°C por uma hora para reanelamento

PRÉ TRATAMENTO DAS LÂMINAS COM METÁFASES

Desidratar as lâminas em série de etanol (70, 90 e 100%, 5 minutos cada)

Deixar secar

Desnaturar em 70% Formamida/2XSSC por 3 minutos a 75°C

Colocar as lâminas imediatamente em álcool 70% a continuar a desidratar. Deixar secar.

Adicione proteinase K ao tampão em uma concentração final de 0.1 ug/ml

Digerir as lâminas por 8 minutos a temperatura ambiente

Repetir a desidratação e deixar secar

HIBRIDIZAÇÃO

Adicionar 30ul da sonda pré-hibridizada às lâminas e selar com cimento de borracha

Colocar em câmara úmida a 37 °C por 3 dias

LAVAGEM PÓS HIBRIDIZAÇÃO

Após 72 horas, lavar o DNA não hibridizado da lâmina

Lavar em formamida 50%/2XSSC por 5 minutos, por 3 vezes, a 45 °C

Lavar em 2XSSC por 5 minutos, por 3 vezes, a 45 °C

Bloquear com 35 ul de solução de bloqueio a 37 °C por 30 minutos

Detectar com FITC/Avidina + Rhodamina Anti-DIG a 37 °C por 30 minutos

Lavar em 4X SSC/0,1% Tween 20 por 5 minutos, por 3 vezes

Contracorar em DAPI/Antifade

5. LEITURA DAS LÂMINAS

Após a hibridização, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência equipados com softwares de captura e análise para CGH: Cytovision (DSS Imagetech) ou CGH-View (Applied Spectral Imaging). Foram analisadas de 7 a 11 metáfases por caso, para o cálculo da razão média para perdas e ganhos para as regiões cromossômicas, por cromossomo, em cada caso. Foi considerada amplificação quando a razão excedeu o limite de 1.2 e deleção quando a razão foi menor que o limite de 0.8. Amplificação foram observadas se a razão ultrapassou 1.5.

Para cada metáfase foram adquiridas imagens com os filtros em comprimento de onda para DAPI, FITC (verde) e Rhodamina (vermelho) e as imagens foram sobrepostas, pelo software.

FIGURAS

Figura 1: Legenda para diagramas de hibridização de cada cromossomo

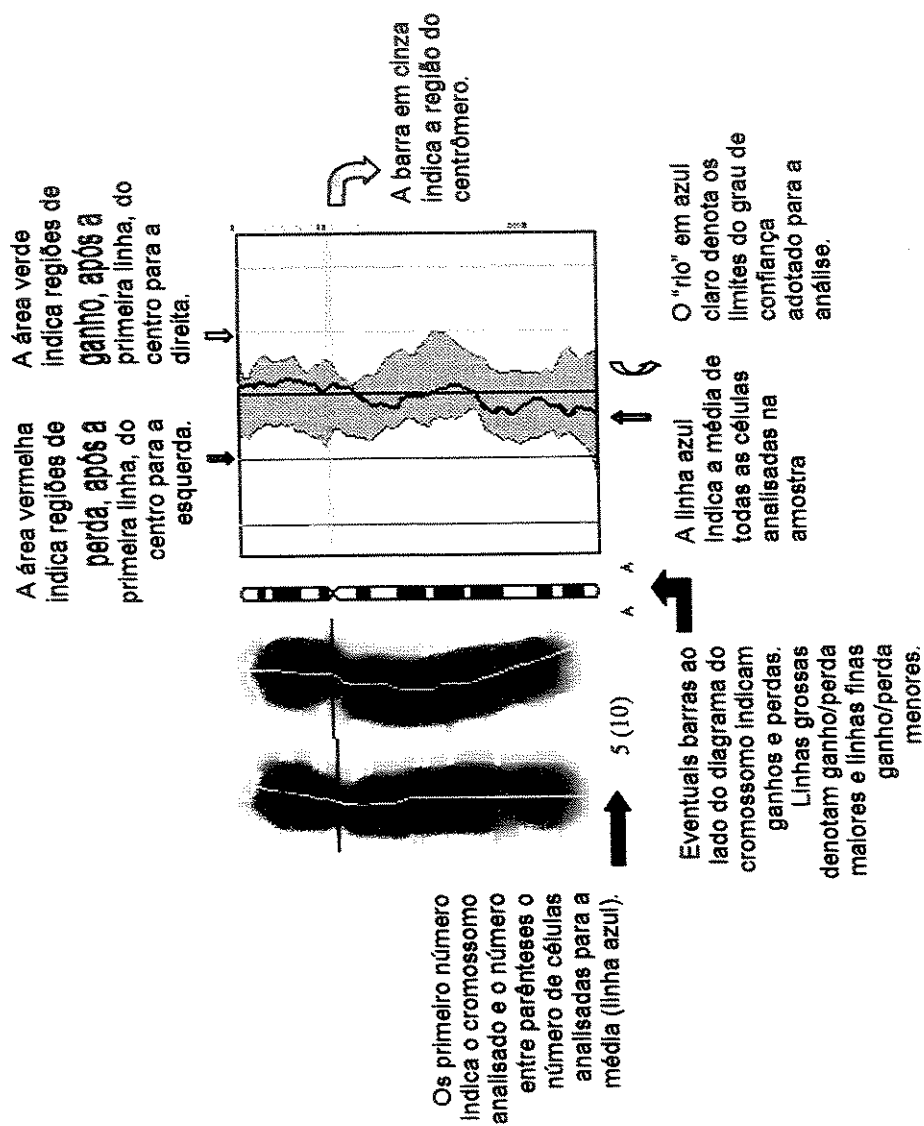


Figura 2: Diagramas de Híbridização para Perdas (vermelho) e Ganhos (verde)

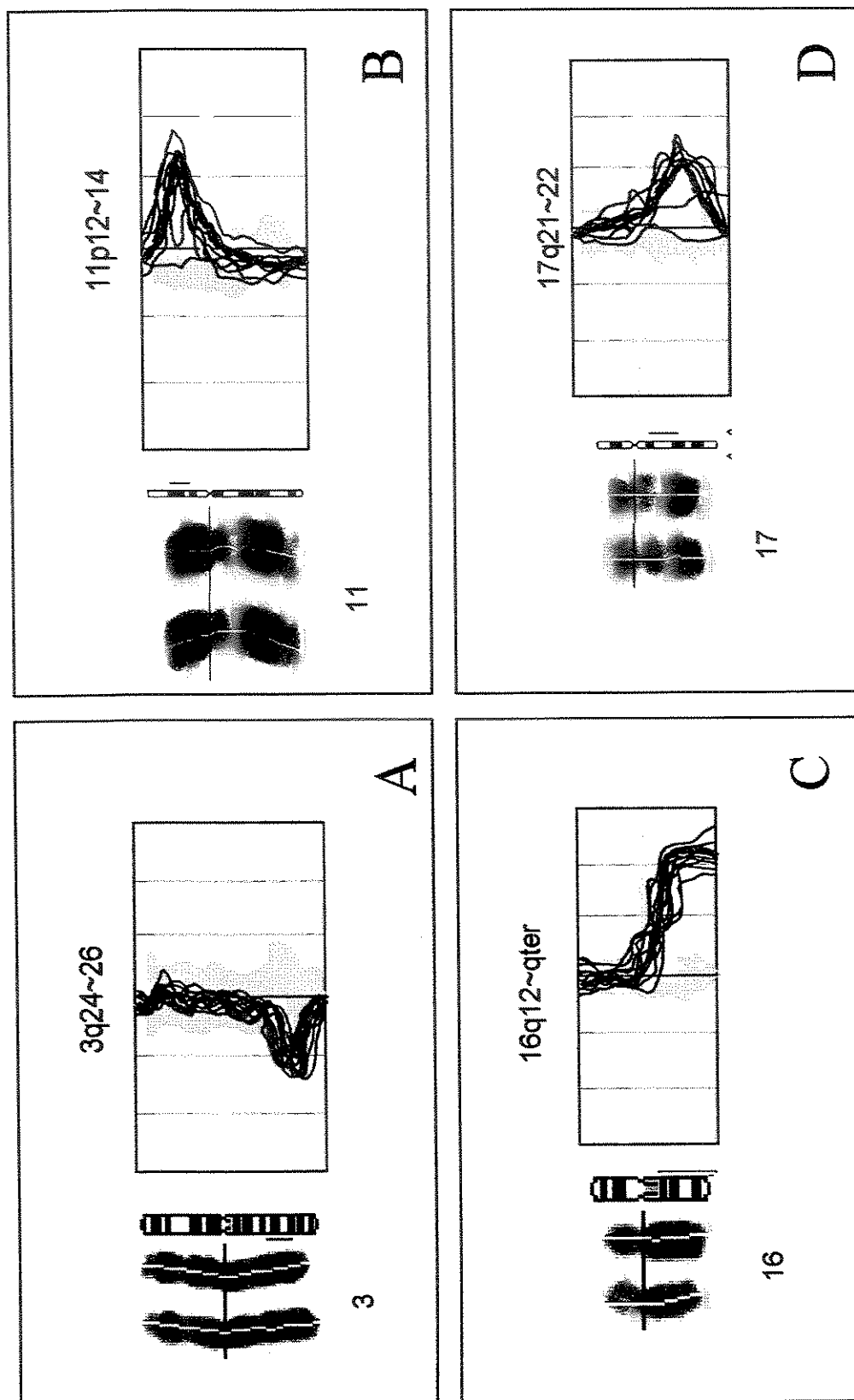


Figura 3: Razões de Híbridização de amostra normal (sem perdas e ganhos)

