

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Papel prognóstico e preditivo do polimorfismo
da *IL-8 -251 T/A* no carcinoma epitelial do ovário

Dânia Sofia Neiva Marques Santos

Dissertação do Mestrado em Oncologia

2011

Dânia Sofia Neiva Marques Santos

**Papel prognóstico e preditivo do polimorfismo da *IL-8 -251 T/A*
no carcinoma epitelial do ovário**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva.

Categoria – Professor associado convidado com agregação.

Filiação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto

Co-orientador – Dra. Deolinda Pereira

Categoria – Chefe de Serviço

Filiação – Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco
Gentil, EPE.

Este trabalho é dedicado

À minha mãe e irmãos, Sara e Miguel, pelo seu amor incondicional.

Aos meus avós maternos, a quem tudo devo.

Ao meu pai, que me levou a ser mais forte.

Aos meus colegas e mestres de profissão, que tratam incansavelmente o sofrimento e o medo, por vezes com uma coragem tão grande quanto a dos seus doentes.

E aos doentes com quem contactei, cujo entusiasmo pela vida nesta época conturbada é, para mim, uma inspiração diária.

Índice geral

Papel prognóstico e preditivo do polimorfismo da <i>IL-8 -251 T/A</i> no carcinoma epitelial do ovário	i
Lista de siglas e abreviaturas.....	vii
Agradecimentos.....	ix
Resumo	xiii
<i>Abstract</i>	xvii
1. Introdução	3
1.1. Carcinoma epitelial do ovário.....	3
1.1.1. <i>Factores de risco para o desenvolvimento de CEO</i>	3
1.1.2. <i>Classificação histológica do CEO</i>	7
1.1.3. <i>Diagnóstico e estadiamento do CEO</i>	11
1.1.4. <i>Tratamento do CEO</i>	14
1.2. Inflamação e cancro: o papel da interleucina 8	19
1.3. Polimorfismos genéticos e cancro: o polimorfismo da <i>IL-8 -251 T/A</i>	23
2. Objectivos do estudo	27
2.1. Objectivo principal.....	27
2.1. Objectivo secundário	27
3. Material e métodos	31
3.1. Desenho do estudo.....	31
3.2. Participantes	31
3.3. Variáveis em estudo	32
3.4. Material e métodos laboratoriais	34
3.5. Material e método de recolha de informação	36
3.6. Cálculo do tamanho da amostra	37
3.7. Material e método de análise estatística	37
3.8. Questões éticas e financiamento	37

4. Resultados	41
4.1. Análise da associação do polimorfismo genético da <i>IL-8 -251 T/A</i> com factores de prognóstico (clínicos e patológicos)	42
4.2. Análise da associação do polimorfismo genético da <i>IL8 -251 T/A</i> com a sobrevivência.....	43
4.3. Análise da associação do polimorfismo genético da <i>IL-8 -251 T/A</i> com a eficácia dos tratamentos efectuados.....	48
5. Discussão.....	57
6. Conclusão	65
Referências	67

Lista de siglas e abreviaturas**A**

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico

C

°C	graus <i>Celsius</i>
CEO	carcinoma epitelial do ovário

D

dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
------	-----------------------------------

E

e.g.	<i>exempli gratia</i> , por exemplo
ESO	epitélio da superfície do ovário
et al.	<i>et alii</i> , e outros
etc.	<i>et cetera</i> , e o que se segue (não significa “outras coisas do género”)

H

HR	<i>hazard ratio</i>
----	---------------------

I

IC95%	índice de confiança a 95%
i.e.	<i>id est</i> , isto é
IL-8	interleucina-8
IPO Porto	Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil

M

M	concentração molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	concentração milimolar

N

n	número
ng	nanograma

P

pág.	página
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
p/v	peso por volume

R

RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
rpm	rotações por minuto
RR	risco relativo

S

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
-----	---------------------------------------

T

T	timina
TBE	<i>tris-borate EDTA buffer</i>

U

U	unidade
µg	microgramas
µL	microlitro
µM	concentração micromolar

V

VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
------	---

X

χ ²	qui-quadrado
----------------	--------------

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Joana Assis e Mestre Mónica Gomes a sua disponibilidade e o seu contributo laboratorial, sem os quais este trabalho não teria sido possível, e ao Dr. Ramon Andrade de Mello, pelo seu apoio na análise estatística.

Resumo

Resumo

Introdução: O polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* influencia a expressão da *IL-8*, potente quimiocina pró-angiogénica independente do VEGF, cuja acção influencia a progressão tumoral e a resistência a fármacos com propriedades anti-angiogénicas (e.g. paclitaxel e bevacizumab). Este estudo pretende avaliar a influência deste polimorfismo no prognóstico e na resposta à quimioterapia (baseada em platinos e taxanos) em doentes com carcinoma epitelial do ovário (CEO) tratadas no IPO Porto.

Material e métodos: Coorte retrospectivo. Genotipagem da *IL-8* -251 T/A efectuada por *PCR-RFLP* de amostras de ADN crioconservadas, obtidas do sangue periférico de doentes com CEO do IPO Porto, entre 05.01.1996 e 22.12.2010. Exposição definida pelos genótipos AA e AT. Analisou-se a relação destes genótipos com os seguintes parâmetros: sobrevivência livre de progressão, sobrevivência global, e resposta aos tratamentos. A análise foi ajustada para os factores: idade, estágio, tipo e grau histológicos, volume de doença residual, e mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. A sobrevivência foi analisada pelo método de *Kaplan-Meier*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados: A genotipagem da *IL-8* -251 T/A foi efectuada em 162 doentes. Frequência dos genótipos: TT=50,6%, AT=49,4%, AA=0,0%. Genótipo AT associado a estádios precoces (RR=2,063, IC95%:1,160-3,910, $p=0,029$), maior risco de recidiva nos estádios precoces (RR=7,333, $p=0,039$), e maior sobrevivência livre de progressão nas doentes com carcinoma de células claras e carcinoma misto com componente de mau prognóstico (166,1 vs 95,2 meses, HR=2,128, $p=0,015$).

Conclusão: O polimorfismo da *IL-8* -251 T/A poderá ser factor de prognóstico no CEO, especialmente nas doentes com carcinoma de células claras. Estudos prospectivos poderão esclarecer o papel desta variante genética no perfil farmacogenómico das doentes com CEO.

Abstract

Abstract

Introduction: The polymorphism -251 T/A of the gene for IL-8 influences the expression of IL-8, a potent pro-angiogenic chemokine independent of VEGF, whose actions influence tumor progression and resistance to pharmacologic agents with anti-angiogenic properties (e.g. paclitaxel and bevacizumab). The aim of this study is to evaluate the influence of this genetic polymorphism in the prognosis and response to chemotherapy (based on platinum and taxanes) in patients with epithelial ovarian cancer (EOC) treated at IPO Porto.

Methods: Retrospective cohort. Genotyping of IL-8 -251 T/A was made by PCR-RFLP of cryoconserved DNA samples obtained from peripheral blood of patients with EOC of IPO Porto, between 05.01.1996 and 22.12.2010. Exposure was defined by genotypes AA and AT. We analyzed the relationship of these genotypes with the following parameters: progression-free survival, overall survival, and response to treatment. The analysis was adjusted for the factors: age, stage, histological type and grade, volume of residual disease, and mutation of the BRCA1 and BRCA2 genes. Survival was analyzed by the Kaplan-Meier method. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: Genotyping of IL-8 -251 T/A was performed in 162 patients. Frequency of genotypes: TT = 50.6%, AT = 49.4%, AA = 0.0%. Genotype AT was associated with early stages (RR = 2.063, 95%CI: 1,160-3, 910, $p = 0.029$), increased risk of relapse in early stages (RR = 7.333, $p = 0.039$) and higher progression-free survival in patients with clear cell carcinoma and mixed carcinoma with a component of poor prognosis (166.1 vs. 95.2 months, HR = 2.128, $p = 0.015$).

Conclusion: IL-8 -251 T/A polymorphism may be a prognostic factor in EOC, especially in patients with clear cell carcinoma. Prospective studies may clarify the role of this genetic variant in the pharmacogenomic profile of patients with EOC.

Introdução

1. Introdução

1.1. Carcinoma epitelial do ovário

O carcinoma epitelial do ovário (CEO) é a principal causa de morte por patologia ginecológica maligna no Mundo e a 5ª causa de morte por cancro nas mulheres.¹ Em 2006, na área abrangida pelo Registo Oncológico Regional do Norte de Portugal, a taxa de incidência de CEO foi de 7.7/100 000 habitantes (6.8/100 000 habitantes se taxa padronizada para a população Europeia) e a razão mortalidade/incidência foi de 50% (mortalidade: 65; incidência: 130).² O facto de ser uma doença frequentemente “silenciosa” (i.e. associada a sinais e sintomas inespecíficos), e de não existir nenhum método de rastreio comprovadamente eficaz, contribui para que a maioria das doentes (cerca de 70%), na altura do diagnóstico, se encontre em fase já avançada da doença (estádios III-IV).³⁻⁵ Assim, apesar dos avanços terapêuticos, a sobrevivência global destas doentes é de 46% aos 5 anos.¹

1.1.1. Factores de risco para o desenvolvimento de CEO

O risco global para CEO na população geral é de apenas 2 a 5%, sendo que na maioria dos casos o desenvolvimento do CEO é esporádico.^{4,5} O pico de incidência do CEO esporádico situa-se pelos 70 anos e declina ligeiramente após os 80 anos.^{6,7} A grande maioria dos casos ocorre em mulheres peri ou pós-menopáusicas (85-90%).⁶ Contudo, uma pequena percentagem das mulheres que desenvolvem CEO apresenta predisposição genética para o desenvolvimento da doença (5 a 10%).^{4,5} Cerca de 90% destas mulheres é portadora de mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2.^{4,5} Estes são genes supressores tumorais responsáveis pela reparação do ADN via recombinação homóloga.⁸ Estes regulam a proliferação celular e são responsáveis pela estabilidade cromossómica. Assim, as células com deficiências na via de reparação de ADN por recombinação homóloga apresentam maior instabilidade cromossómica e maior risco de transformação maligna.^{8,9} Algumas das características clínicas do CEO associado a mutações hereditárias do BRCA1 e do BRCA2 incluem: idade mais jovem, associação de vários cancros no mesmo doente (e.g. cancro da mama) e história familiar de cancro de ovário e/ou da mama (tabela 1).⁴

Tabela 1. Mulheres com risco superior a 20-25% de possuírem predisposição hereditária para cancro do ovário e da mama e para as quais se recomenda aconselhamento genético ⁴

Mulheres com história pessoal de cancro da mama e ovário
Mulheres com cancro de ovário e parente próximo (1 ^o -3 ^o grau) com cancro da mama em idade ≤ 50 anos ou cancro de ovário em qualquer idade
Mulheres com cancro de ovário em qualquer idade e ascendência de judeus Ashkenazi
Mulheres com cancro da mama ≤50 anos e familiar próximo com cancro de ovário ou cancro da mama em homem em qualquer idade
Mulheres com ascendência Ashkenazi e cancro da mama ≤40 anos
Mulheres com parente de 1 ^o ou 2 ^o grau com mutação conhecida nos genes BRCA1 ou BRCA2

O risco de desenvolvimento de CEO aumenta ao longo da vida destas mulheres e pode variar, conforme a idade, de 20 a 60% nas mulheres com mutações no gene BRCA1 e de 10 a 35% nas mulheres com mutações no gene BRCA2.⁸ Apesar disso, as mulheres com CEO e mutação do BRCA1 ou do BRCA2 parecem apresentar melhor prognóstico que as mulheres com CEO esporádico (i.e. maior sobrevivência global e maior sobrevivência livre de progressão).⁹ Tal poderá ser explicado pelo facto das células malignas com mutações nos genes do BRCA1 ou do BRCA2 serem muito mais sensíveis aos tratamentos com platinos (com maiores taxas de resposta sustentadas), porque não conseguem reparar os danos provocados no ADN pelos aductos dos platinos.⁹ Actualmente, este é o único grupo de mulheres para as quais se recomenda o rastreio, na ausência de sintomas, com a combinação de exame pélvico, doseamento sérico de CA 125 e ecografia pélvica endovaginal a cada 6 meses a partir dos 35 anos, ou 5 a 10 anos antes do caso de CEO diagnosticado na familiar de idade mais jovem.^{3,4,8} Outra opção recomendada é a salpingo-ooforectomia bilateral profilática.^{4,8}

Desde há longa data que têm sido propostas várias hipóteses na tentativa de clarificar os mecanismos fisiológicos subjacentes ao aumento de risco de transformação maligna do epitélio do ovário nos casos de CEO esporádicos. A observação de que mulheres com maior número de ciclos ovulatórios apresentavam um maior risco de desenvolvimento de CEO levou à hipótese da ovulação incessante, por Fathala, em 1971.¹⁰

Segundo esta hipótese, após cada ovulação, parte das células do epitélio da superfície do ovário (ESO) são danificadas e outras internalizadas no estroma ovárico (formando quistos de inclusão). Os mecanismos de reparação do ESO subsequentes aumentariam o risco de desenvolvimento de mutações e transformação maligna das células.¹⁰ Por outro lado, os quistos de inclusão poderiam permanecer quiescentes no estroma ovárico por longos períodos de tempo, regredir e desaparecer, ou então sofrer alterações e danos que proporcionariam a sua transformação maligna.¹⁰ Realmente, mulheres nulíparas, com idade de menarca precoce, e com idade de menopausa tardia, apresentam um risco aumentado para CEO, enquanto mulheres múltiparas, que amamentam por períodos de tempo mais prolongados, e que utilizam anti-concepcionais orais (ACO), apresentam menor risco de desenvolverem CEO.^{4,11} Contudo, apesar da teoria da ovulação incessante conciliar alguns dados epidemiológicos e experimentais, os mecanismos subjacentes permanecem pouco esclarecidos. Além disso, não fornecia explicação plausível para outros factores de risco conhecidos para o CEO (e.g. mulheres com síndrome de ovário poliquístico que têm menos ciclos ovulatórios). Deste modo, teorias alternativas foram propostas de modo a explicar esses outros factores.^{6,7,12,13}

Após a ovulação, as células do ESO necessitam de sofrer alterações de modo a iniciar o processo de cicatrização epitelial. Para tal, elas são dotadas da capacidade de sofrerem alterações fenotípicas de modo a adquirirem características tipo-fibroblasto (transição epitélio-mesenquimatosa).^{5,14} Durante este processo de transição, elas perdem a função de várias moléculas de adesão (como por exemplo a caderina E) e ganho de marcadores mesenquimatosos (como a vimentina). De seguida, há perda da polarização basoapical da célula, o citoesqueleto sofre remodelações e a célula adquire a capacidade de mobilização e de secretar várias enzimas proteolíticas (como metaloproteinases) de modo a alterar e degradar a adesão da célula à matriz extra-celular.¹⁴ Pensa-se que este é um mecanismo homeostático que, em condições normais, permite que as células do ESO não só participem nos mecanismos de cicatrização da ferida pós-ovulatória como lhes permite a incorporação no estroma ovárico sob a forma de fibroblastos, quando neles encarceradas. Este é um processo autolimitado e reversível, sendo que as células voltam a adquirir o seu fenótipo epitelial no final do processo (transição mesenquimatosa-epitelial).⁵ Segundo a hipótese do estroma, a formação de quistos de inclusão com células epiteliais do ESO incapazes de sofrer a transição epitélio-mesenquimatosa e a sua continuada exposição ao ambiente hormonal, rico em estrogéneos, próprio do estroma ovárico, levaria à sua proliferação e transformação maligna.⁶

Este conceito pode ser amplificado pela teoria das gonadotropinas, inicialmente sugerida por Cramer e Welch em 1983.¹² Resumidamente, eles sugeriram que a influência hormonal das gonadotropinas em níveis excessivos (hormona folículo-estimulante – FSH e hormona luteinizante – LH) e consequente estimulação do estroma ovárico com aumento da produção de estrogéneos e seus precursores, levaria à proliferação e transformação maligna das células do ESO encarceradas no estroma ovárico sob a forma de quistos de inclusão.¹² Estas hipóteses são consistentes com os efeitos protectores conhecidos da multiparidade, amamentação e utilização prolongada de ACO^{11,12}, assim como com alguns factores de risco conhecidos, como factores endócrinos relacionados com a menopausa, a idade, a utilização de terapêutica hormonal de substituição e a infertilidade (sendo que não parece haver relação entre os tratamentos hormonais utilizados para seu tratamento e o aumento de risco de CEO)^{4,7,15,16}. Os dados epidemiológicos também são consistentes com a teoria das gonadotropinas, pela proximidade temporal existente entre a elevação de gonadotropinas circulantes e o pico de incidência de CEO. A cessação completa da função ovárica resulta na perda do “*feedback*” negativo dos esteróides produzidos no ovário sobre a libertação de gonadotropinas. Deste modo, os níveis circulantes de LH e FSH atingem níveis máximos 2 a 3 anos após a menopausa, permanecendo elevados após isso.⁶ Estas hormonas são capazes de promover a sobrevivência, crescimento, migração e angiogénese das células tumorais.^{6,17} Por outro lado, a hipótese dos androgéneos *versus* progesterona sugere que níveis aumentados de androgéneos (situação comum em mulheres pós-menopáusicas, obesas e com síndrome de ovários poliquísticos) aumentaria o risco para CEO enquanto níveis aumentados de progesterona, que por sua vez se associam a níveis de testosterona diminuídos no ovário (e.g. exposição a contraceptivos orais progestativos e a própria gravidez), seria factor protector para o CEO.^{6,7}

Finalmente, também o papel da inflamação na carcinogénese do ovário tem suscitado bastante interesse. Segundo esta última hipótese, a libertação de citocinas (e.g. interleucinas – IL-6 e 8, óxido nítrico, prostaglandinas, factor de necrose tumoral α), fluxo de células inflamatórias e regeneração tecidual, que ocorre após cada ovulação, poderá ser responsável pela transformação maligna das células do ESO.¹³ Consistente com esta hipótese, a ingestão crónica de anti-inflamatórios não esteróides e a laqueação tubar diminuem o risco de CEO, enquanto condições pró-inflamatórias (e.g. doença inflamatória pélvica, endometriose) aumentam o risco de CEO.¹³ O facto de nenhuma destas hipóteses ser completamente satisfatória sugere que vários mecanismos poderão estar envolvidos no modelo de carcinogénese do ovário.

1.1.2. Classificação histológica do CEO

Cerca de 90% dos tumores malignos do ovário têm origem epitelial.³ O CEO compreende vários subtipos histológicos bastante heterogêneos entre si. Dependendo do tipo celular, eles podem ser classificados em tumores serosos (30-70%), mucinosos (5-20%), endometrióides (10-20%), de células claras (3-10%), de Brenner (células de transição), carcinosarcomas ou indiferenciados (1%).¹⁸ Subsequentemente, estes tumores são subdivididos em 3 categorias de prognóstico, i.e. tumores benignos, tumores malignos (i.e. carcinomas) e tumores de malignidade intermédia ou “borderline” (e.g. tumores de baixo potencial maligno e tumores proliferativos atípicos).³

A. Origem do CEO: paradoxo ou navalha de Ockham?

Um dos aspectos mais intrigantes e menos compreendidos do CEO correlaciona-se com a histogénese destes tumores. Comumente aceite como tendo a sua origem em células do epitélio da superfície do ovário (ESO)^{3,10} torna-se difícil explicar como estas células podem dar origem a tão amplo espectro de subtipos histológicos, tão distintos das células de origem, mas morfológicamente idênticos às neoplasias primárias do tracto genital feminino.¹⁹ Assim, o subtipo seroso é semelhante aos tumores originários das trompas de Falópio, o subtipo mucinoso aos tumores originários do endocérvix e o subtipo endometrióide aos tumores originários do endométrio.^{5,19,20} As células do ESO e do tracto genital feminino têm uma origem embrionária comum, o epitélio celómico, mas cedo se distinguem através de mecanismos de desenvolvimento embrionário diferentes.⁵ Enquanto as células do ESO continuam relacionadas com o epitélio celómico (tal como as células do epitélio peritoneal, adquirindo características tipo-mesotélio), as células que darão origem a grande parte do tracto genital feminino começam a invaginar dando origem aos ductos mullerianos (adquirindo características tipo-mullerianas). As porções distais destes ductos acabam por se fundir na linha média dando origem ao útero, cérvix e parte superior da vagina enquanto as porções proximais permanecem separadas dando origem às trompas de Falópio direita e esquerda.^{5,20} Então, porque razão os principais tipos histológicos de CEO têm uma aparência tipo-mulleriana e não tipo-mesotelioma? Para não falar de subtipos histológicos menos comuns, como o de células claras (tipo-mesonéfrico) e o de células de transição ou tumor de Brenner (tipo-urotelial), cujas características histológicas se assemelham a tecidos que embriologicamente se encontram ainda mais distantes do ESO. Se considerarmos a hipótese do CEO ter

origem no ESO como verdadeira teremos que aceitar que as células do ESO, à semelhança das células estaminais, mantêm a capacidade de se diferenciar em células com características embrionárias diferentes (e.g. tipo-mulleriano) e estaríamos perante o paradoxo do CEO ser dos únicos tumores sólidos com esta característica (i.e. infidelidade de linhagem).^{20,21}

Alguns estudos em linhas celulares animais têm vindo de encontro a esta teoria. Os genes homeobox, da família *HOX*, foram originalmente identificados na *Drosophila* como factores determinantes na identidade de segmentos e na codificação de factores de transcrição.²⁰ Nos mamíferos, a expressão diferencial dos genes desta família controla o padrão de desenvolvimento embrionário. Deste modo, o *Hoxa9* é expresso nos primórdios das trompas de Falópio, o *Hoxa10* no útero em desenvolvimento, o *Hoxa11* em regiões destinadas a ser o segmento uterino inferior e cérvix, o *Hoxa13* a futura parte superior da vagina.^{20,21} A expressão destes genes mantém-se espacialmente restricta ao tracto reprodutivo adulto, estando ausente do ESO.²¹ A expressão diferencial destes genes é recapitulada nos CEO serosos, mucinosos e endometrioides.²¹ Células derivadas do ESO do ratinho isoladas apresentam diferenciação em linhagens distintas de tecidos mullerianos conforme os genes *HOX* expressos: *HOXA9* – tumores papilares semelhantes aos tumores serosos de alto grau; *HOXA 10* e *11* – tumores de alto grau do tipo endometriode e mucinoso.²⁰ Apesar de todo o conjunto de evidências trazidas da observação clínico-patológica e da investigação (essencialmente em linhas celulares animais) a grande limitação desta teoria encontra-se no facto de, até à data, nunca se ter conseguido identificar qualquer lesão precursora de CEO no ESO. Podemos comprovar variados mecanismos de promoção e progressão tumorais biologicamente plausíveis mas não temos qualquer prova acerca da iniciação tumoral.¹⁹

Vários autores têm proposto uma teoria alternativa para explicar a origem do CEO.^{19,22,23} Segundo estes autores a origem do CEO poder-se-á encontrar em tecidos vizinhos ao ovário e não no ESO.^{19,22,23} Por exemplo, os tumores serosos podem ser primários de outras estruturas anatómicas para além dos ovários, como o peritoneu ou as trompas de Falópio, apesar de serem reportados com uma frequência bastante inferior.^{19,22,23} Contudo, ao contrário do ESO, é frequente identificarem-se lesões precursoras de carcinomas serosos nestes casos, assim como nas trompas de Falópio de mulheres portadoras de mutações nos genes *BRCA1/2* submetidas a salpingo-ooforectomia profilática.^{19,22,23} Seria possível que grande parte dos tumores serosos primários do ovário fosse, na realidade, primária das trompas de Falópio? Assim sendo, a presença dos quistos de inclusão com epitélio mulleriano nos ovários poderia ser

explicada pelo facto das trompas de Falópio rasparem de encontro aos ovários durante cada ovulação e também por estas se encontrarem muitas vezes aderentes aos ovários em condições inflamatórias.^{19,23} Outra origem plausível para o CEO seria o Sistema Mulleriano Secundário.¹⁹ Este sistema é constituído por remanescentes da porção mais proximal dos ductos mullerianos. Estas estruturas resquiciais são frequentemente observadas na vizinhança dos ovários (áreas para-ováricas e para-tubares) e encontram-se com maior densidade no hilo ovárico (rete ovarii), sendo muitas vezes observados na própria medula do ovário.¹⁹ Contudo, também podem ser encontradas em tecidos mais distantes, como por exemplo, em gânglios linfáticos.¹⁹ No fundo, este sistema é constituído por todo um conjunto de estruturas e tecidos com características mullerianas existentes fora do útero, cérvix e trompas de Falópio e que, conforme as suas características, adquirem nomações como endosalpingiose e endometriose.¹⁹

B. Classificação do CEO segundo comportamento biológico e alterações genéticas

Em 2008, Kurman *et al* propuseram uma nova classificação do CEO, baseados no comportamento biológico e alterações genéticas dos vários subtipos histológicos.²⁴ Esta classificação divide o CEO em dois tipos de tumores: tipo I e tipo II (figura 1).^{22,24,25}

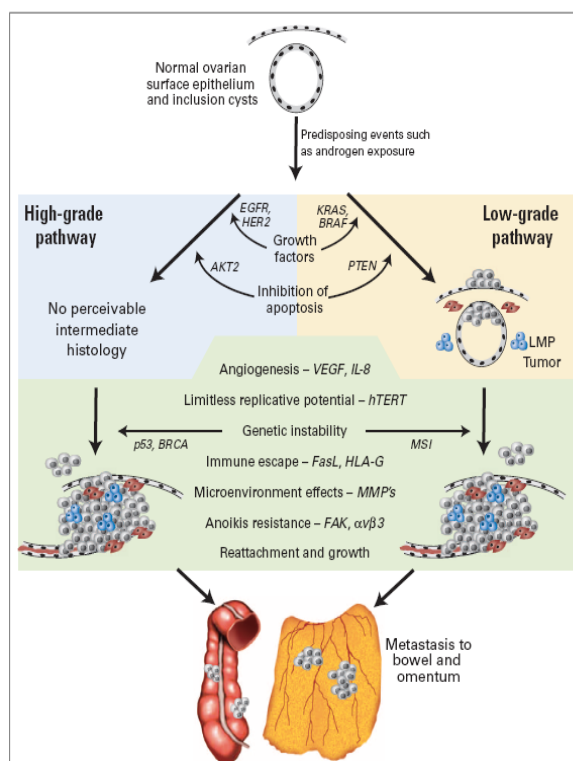


Figura 1. Modelo de carcinogénese no ovário.

O ESO está exposto a vários processos fisiológicos que poderão predispor-lo à transformação maligna (e.g. exposição a androgénios, inflamação). Várias características deverão ser adquiridas por estas células de modo a que o seu potencial maligno seja satisfeito (descritas sumariamente no centro da figura; exemplos em itálico). O tipo de alterações precoces observado durante a carcinogénese poderá justificar as diferenças de agressividade dos vários tipos histológicos que surgem no CEO. Por exemplo, mutações que favorecem o crescimento e resistência à apoptose, (e.g. *K-RAS*), frequentemente originam tumores de baixo potencial maligno. Por outro lado, mutações que geram instabilidade genética, como a do *p53*, favorecem o aparecimento de outras mutações e a rápida progressão e metastização tumorais, como ocorre em tumores de alto grau de malignidade (e.g. carcinoma papilar-seroso de alto grau). Figura extraída do *Journal of Clinical Oncology* 26, pág.1002 (2008)²²

Os tumores tipo I incluem aqueles com origem em lesões precursoras bem caracterizadas, como os tumores “*borderline*”, e incluem tumores com comportamento biológico variável (i.e. carcinomas endometrióide, mucinoso e de células claras) e tumores de crescimento lento (i.e. carcinomas serosos de baixo grau). Caracterizam-se por apresentarem crescimento indolente, alterações genéticas relativamente estáveis e mutações em vários genes diferentes (e.g. K-RAS, BRAF, PTEN e β -catenina), má resposta à quimioterapia e sobrevivência global aos 5 anos de cerca de 55%.^{18,24,25} A tabela 2 mostra as alterações genéticas mais frequentes nos tumores tipo I, por subtipo histológico e respectivas lesões precursoras.

Tabela 2. Alterações genéticas e lesões precursoras dos tumores tipo I do ovário^{18,24,25}

Tipos histológicos	Lesões precursoras	Alterações genéticas conhecidas
Carcinoma seroso de baixo grau	Cistadenoma seroso/adenofibroma Tumor seroso proliferativo atípico Carcinoma micropapilar seroso não invasivo	Mutações do <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> (~67%)
Carcinoma mucinoso	Cistadenoma mucinoso Tumor mucinoso proliferativo atípico Carcinoma intra-epitelial	Mutações do <i>KRAS</i> (>60%)
Carcinoma endometrióide	Endometriose Adenofibroma endometrióide Tumor endometrióide proliferativo atípico Carcinoma intra-epitelial	Perda de heterozigotia ou mutações do <i>PTEN</i> (20%); mutações da β -catenina (16-54%); mutações do <i>KRAS</i> (4-5%); instabilidade de microssatélites (13-50%)
Carcinoma de células claras	Endometriose Adenofibroma de células claras Tumor de células claras proliferativo atípico Carcinoma intra-epitelial	Mutações do <i>KRAS</i> (5-16%); instabilidade de microssatélites (~13%)
Tumor maligno de Brenner (células de transição)	Tumor de Brenner Tumor de Brenner proliferativo atípico	Ainda não identificadas

Os tumores tipo II são tumores de alto grau, biologicamente agressivos, sem lesões precursoras identificadas (pensando-se que surjam *de novo* do epitélio celómico), e respondem bem à quimioterapia.^{22,24,25} O carcinoma seroso de alto grau constitui o protótipo histológico deste tipo de tumores. Outros subtipos histológicos estão incluídos neste grupo, como o carcinoma de células de transição de alto grau, o carcinosarcoma, e os carcinomas indiferenciados.^{18,24,25} Os tumores tipo II apresentam grande instabilidade genética, mutações frequentes da *p53* e dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, e sobrevivência global aos 5 anos de cerca de 30%.^{24,25} A tabela 3 mostra os subtipos histológicos, lesões precursoras e alterações genéticas mais frequentes nos tumores tipo II.

Tabela 3. Alterações genéticas e lesões precursoras dos tumores tipo II do ovário^{18,24,25}

Tipos histológicos	Lesões precursoras	Alterações genéticas conhecidas
Carcinoma seroso de alto grau	Ainda não identificadas	Mutações da <i>p53</i> (50-80%); Amplificação e sobre-expressão dos genes <i>HER2/neu</i> (10-20%) e do <i>AKT2</i> (12-18%); Inativação da <i>p16</i> (10-17%)
Carcinoma indiferenciado	Ainda não identificadas	Ainda não identificadas
Carcinosarcoma	Ainda não identificadas	Mutações da <i>p53</i> (> 90%)

1.1.3. Diagnóstico e estadiamento do CEO

As doentes com CEO em estágio precoce apresentam-se, na maioria das vezes, com sintomas inespecíficos que facilmente podem ser atribuídos a outras patologias benignas (e.g. desconforto abdominal, alterações do trânsito intestinal, saciedade precoce, dispepsia, distensão abdominal, irregularidades menstruais).⁵ Nos estádios mais avançados, podem apresentar-se com sinais e sintomas mais severos, como massa pélvica ou adenopatias palpáveis, distensão abdominal (e.g. por ascite), oclusão intestinal (e.g. por carcinomatose peritoneal) ou dispneia (e.g. por derrame pleural).⁵ O doseamento do CA125 sérico tem sido largamente utilizado como marcador tumoral do CEO, durante a abordagem inicial de doentes com massa anexial suspeita.³

O CA125 é um peptídeo repetitivo epítoto da mucina de alto peso molecular MUC16. A MUC16 é expressa normalmente pelos epitélios da superfície ocular, tracto respiratório superior e mesotélio (cavidades pelural, peritoneal e pélvica), tendo uma função protectora e lubrificadora destas superfícies.²⁶

Esta mucina é expressa em níveis baixos pelo ESO, mas em grandes quantidades pelo CEO. As células tumorais secretam a MUC16 para a cavidade abdominal e, desta, a MUC16 passa para a corrente sanguínea, onde pode ser detectado pelos métodos serológicos de determinação do CA125.^{5,26}

Apesar dos níveis do CA125 poderem estar aumentados em cerca de 80% dos casos de CEO avançado, o mesmo não acontece para os estádios iniciais, onde menos de 50% dos casos apresentam elevação do CA125, apresentando baixo valor preditivo positivo.⁴

Do mesmo modo, o CA125 também pode estar aumentado em condições benignas (e.g. endometriose, diverticulite, quistos ováricos benignos, abscessos pélvicos, gravidez ectópica, e até durante a menstruação e gravidez) e em outras condições malignas (e.g. carcinomas do pâncreas, mama, pulmão, bexiga e fígado), pelo que a sua especificidade também é baixa.^{4,26}

A utilização do doseamento sérico do CA125 associado a ecografia endovaginal aumenta a sensibilidade de detecção do CEO em estádios precoces, sendo, por isso, um método considerado eficaz na abordagem inicial de mulheres com sinais e sintomas sugestivos de CEO.²⁷

Actualmente, encontram-se em desenvolvimento outros marcadores séricos para detecção precoce do CEO (e.g. associação do CA125 e HE4 [*human epididymis protein 4*], osteopontina, mesotelina, CA 72.4, EGFR, ERBB2).^{28,29}

O diagnóstico definitivo é histológico e deve ser obtido através da cirurgia.³ O estadiamento do CEO, de acordo com as “*guidelines*” da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), também é cirúrgico (tabela 4).³⁰

Tabela 4. Estadiamento do CEO (FIGO 2009).³⁰

Estádio I	Tumor limitado aos ovários
IA	Limitado a 1 ovário; cápsula intacta; superfície sem tumor; lavado peritoneal negativo
IB	Limitado aos 2 ovários; cápsula intacta; superfície sem tumor; lavado peritoneal negativo
IC	IA ou IB com um dos seguintes critérios: ruptura da cápsula, extensão do tumor à superfície ovárica, lavado peritoneal positivo
Estádio II	Tumor envolvendo um ou os dois ovários, com extensão pélvica
IIA	Extensão ou implantes ao útero ou trompas e lavado peritoneal negativo
IIB	Extensão ou implantes a outros tecidos pélvicos e lavado peritoneal negativo
IIC	IIA ou IIB com: ruptura de cápsula, extensão do tumor à superfície ovárica, ascite ou lavado peritoneal positivo para células malignas
Estádio III	Tumor envolvendo um ou os dois ovários, com implantes peritoneais confirmados histologicamente fora da pelve ou invasão de gânglios linfáticos regionais; inclui metástases hepáticas superficiais e tumores limitados à pelve verdadeira, mas com extensão ao intestino delgado ou omento.
IIIA	Tumor limitado à pelve verdadeira (em grande parte), gânglios linfáticos negativos, e presença de metástases peritoneais microscópicas fora da pelve ou extensão ao intestino delgado ou ao mesentério
IIIB	Tumor de 1 ou dos 2 ovários, com implantes peritoneais macroscópicos \leq 2cm (confirmados histologicamente), gânglios linfáticos negativos
IIIC	Implantes peritoneais além da pelve $>$ 2cm (confirmados histologicamente) ou metastização ganglionar regional
Estádio IV	Tumor envolvendo um ou os dois ovários, com metástases à distância; inclui o derrame pleural com citologia positiva para células malignas e as metástases hepáticas parenquimatosas.

1.1.4. Tratamento do CEO

A. Estádios precoces (FIGO I-IIA)

O estadiamento cirúrgico é essencial na abordagem de doentes com CEO em estágio precoce, porque fornece a maior parte da informação prognóstica sobre a doença e tem impacto na sobrevivência global, influenciando todas as atitudes terapêuticas posteriores.³ A cirurgia de estadiamento ótima deve ser realizada por um ginecologista, ou cirurgião, com experiência na abordagem do CEO e compreende a histerectomia total e ooforectomia bilateral (ou unilateral no estágio IA, se intenção de preservar a fertilidade) com inspeção e palpação de todas as superfícies peritoneais, biópsia de todas as lesões suspeitas de metástases, colheita de lavado peritoneal, omentectomia infracólica, biópsias cegas (do hemidiafragma direito, goteiras paracólicas direita e esquerda, paredes pélvicas, fossa ovárica, peritôneu vesical e fundo de saco), linfadenectomia aleatória de gânglios ilíacos e para-aórticos, e apendicectomia (nos carcinomas mucinosos).^{3,30} A sobrevivência global aos 5 anos de doentes com CEO em estágio precoce (FIGO estádios I-IIA), submetidas a cirurgia, varia entre 50 e 85% (dependendo de factores de prognóstico como idade, estágio, tipo histológico, grau tumoral, ruptura de cápsula, presença de ascite e envolvimento da superfície do ovário pelo tumor).^{3,31,32} Neste contexto, as doentes consideradas de risco intermédio e de alto risco (i.e. estádios IA a IB graus 2 a 3, estádios IC a IIA independentemente do grau, e todas as doentes com carcinoma de células claras) têm indicação para serem tratadas com quimioterapia adjuvante.³ Esta indicação fundamenta-se, essencialmente, no resultado de dois estudos randomizados de fase III, conduzidos pelo *International Collaborative Ovarian Neoplasm (ICON1)* e pela *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (com o estudo *Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasms: ACTION*).^{33,34} A análise conjunta destes estudos integrou 925 doentes com CEO submetidas a cirurgia, em estádios I-II, que foram randomizadas em dois ramos de estudo (observação *versus* quimioterapia adjuvante baseada em platinos), e mostrou haver um aumento significativo da sobrevivência global aos 5 anos (redução do risco relativo de morte de 33% [HR=0,67, IC95%: 0,5-0,9, $p=0,008$]) e da sobrevivência livre de recidiva (redução do risco relativo de recidiva de 36% [HR=0,64, IC95%: 0,50-0,82, $p=0,001$]) no ramo de doentes submetidas a quimioterapia adjuvante.³¹ Contudo, apenas 1/6 das doentes estudadas nestes ensaios clínicos foi submetida a cirurgia de estadiamento ótima. Tal poderá significar que parte das doentes incluídas nestes estudos foi, na realidade, sub-estadiada.

Neste contexto, os resultados do ACTION (recentemente actualizados, com tempo médio de seguimento de 10,1 anos) mostraram benefício estatisticamente significativo em termos de sobrevida global e livre de recidiva apenas para as doentes submetidas a cirurgia de estadiamento sub-ótima.³⁵ O tipo de cirurgia efectuado (ótima *versus* sub-ótima) é indicadora da probabilidade de existência de doença residual inaparente e o benefício observado para a quimioterapia adjuvante (essencialmente nas doentes submetidas a cirurgia de estadiamento sub-ótima) poderá ser indicador de benefício de quimioterapia adjuvante apenas nas doentes com doença residual apreciável.³⁵ Apesar disso, a indicação para tratamento adjuvante com quimioterapia nestas doentes mantém-se independentemente do tipo de cirurgia efectuado (ótimo ou sub-ótimo), visto não se poder excluir o seu benefício nas doentes submetidas a cirurgia ótima de risco intermédio ou elevado.³

A quimioterapia baseada em platino e paclitaxel tem sido o tratamento de eleição para estas doentes desde 1996, após se ter demonstrado, com o estudo GOG 111, que a combinação de cisplatina e paclitaxel aumentava a sobrevivência global (de 24 para 38 meses; $p = 0,0016$) e a sobrevivência livre de doença (de 13 para 18 meses; $p = 0,0005$) quando comparado com a ciclofosfamida e cisplatina (esquema anteriormente utilizado), em doentes com CEO em estádios III e IV.³⁶ Mais tarde, a utilização de cisplatina foi substituída por carboplatina, visto esta se ter mostrado menos tóxica e igualmente eficaz (estudo GOG 114).³⁷ Os estudos realizados até à data com outros esquemas de combinação, tanto com dois ou três agentes citotóxicos, não se mostraram superiores à combinação de paclitaxel com platino, pelo que este permanece o regime *standard* no tratamento do CEO.³ O número de ciclos recomendado é de 6, visto que a realização de mais ciclos não se mostrou superior (além de provocar mais efeitos laterais, especialmente associados à neurotoxicidade) e a realização de menos ciclos parece ser menos eficaz (mas tal não está completamente clarificado visto o estudo que compara a realização de 3 *versus* 6 ciclos de carboplatina e paclitaxel ter pouco poder estatístico e as diferenças nele descritas em termos de sobrevivência global e livre de doença não serem estatisticamente significativas, apesar de favorecerem os 6 ciclos).³⁸ Em doentes com baixa capacidade funcional ou co-morbilidades que limitem a utilização de esquemas de poliquimioterapia, pelo risco de toxicidade associado, é recomendada a utilização de carboplatina em monoterapia.³ Este esquema revelou-se similar à administração de carboplatina e paclitaxel, em termos de sobrevivência global e livre de doença, em doentes com CEO em estágio precoce.³⁹ Outro esquema opcional, especialmente nos doentes com risco elevado de neurotoxicidade (e.g. diabéticos), é a associação carboplatina e docetaxel.⁴⁰

B. Estádios avançados (FIGO IIB-IV)

O tratamento do CEO em estágio avançado padrão passa pela cirurgia de cito-redução máxima seguida de quimioterapia baseada na associação de um agente derivado da platina com o paclitaxel (utilizando-se os protocolos descritos na secção dos estádios precoces).³ Cerca de 15% das doentes com CEO encontram-se em estágio IV ao diagnóstico.³ A sobrevivência global aos 5 anos das doentes com CEO avançado varia entre 65%, para os estádios IIB, e 20%, para os estádios IV.³

A cirurgia de cito-redução “ideal” (definida, desde 1986, por um volume de doença residual, após a cirurgia, inferior a 1cm na sua dimensão máxima) parece estar associada com um aumento da sobrevivência nas doentes com CEO avançado (aumento de 50% da mediana de sobrevivência global nas doentes com cirurgia de cito-redução superior a 75% [33,9 meses], em comparação com as doentes com cirurgia de cito-redução inferior a 25% [22,7 meses]; $p = 0,001$).⁴¹ De igual modo, é mais provável que um ginecologista oncológico, com experiência na cirurgia do CEO, efectue uma cirurgia de cito-redução “ideal” (cirurgia ideal em 81,7% dos casos, com mediana de sobrevivência global das doentes de 35 meses), do que um cirurgião de outras especialidades (cirurgia ideal em 29,2%, com mediana de sobrevivência global das doentes de 17 meses; $p < 0,001$), pelo que a cirurgia do CEO deve ser efectuada por uma equipa com experiência.⁴² Teoricamente, a redução do volume tumoral antes da quimioterapia pode ter vários efeitos benéficos, como por exemplo, levar a uma sincronização da divisão celular, aumentar a concentração e disponibilidade dos agentes de quimioterapia nas células tumorais, reduzir o número de ciclos de quimioterapia necessários para erradicar a doença residual existente, e diminuir o desenvolvimento subsequente de resistência à quimioterapia.³ Se a cirurgia de cito-redução máxima inicial não for possível, a cirurgia de cito-redução de intervalo deve ser considerada nas doentes com resposta (i.e. resposta completa, resposta parcial, ou doença estável) à quimioterapia, idealmente após três ciclos da quimioterapia neoadjuvante, devendo ser seguida por mais três a seis ciclos de quimioterapia adjuvante, com o mesmo esquema.⁴³

Em 2009, um estudo japonês de fase III mostrou que a utilização de carboplatina AUC6 no D1 associado a paclitaxel 80mg/m² semanal (D1, D8 e D15), a cada 3 semanas, por 6 a 9 ciclos, é superior ao esquema tradicional de carboplatina AUC6 D1 associado a paclitaxel 180mg/m² no D1, a cada 3 semanas por 6 a 9 ciclos.⁴⁴

Contudo, neste estudo, menos de metade das mulheres estudadas foi sujeita a cirurgia de cito-redução óptima (o que, como referido anteriormente, tem influência na resposta obtida com a quimioterapia adjuvante), e 27% das doentes no ramo de controlo não completou o tratamento conforme planeado por toxicidade. Isto poderia significar que a superioridade derivada da utilização de um esquema com intensificação de dose de paclitaxel se poderia dever a estas condicionantes e não a um real benefício. No entanto, os resultados obtidos com a utilização semanal de paclitaxel são bastante interessantes (sobrevivência global aos 3 anos de 72,1% *versus* 65,1%, intervalo de confiança a 95% [IC95%]: 0,57-0,98, $p = 0,03$; sobrevivência livre de doença de 28 *versus* 17,2 meses, IC95%: 0,58-0,88, $p = 0,0015$), e este esquema apresenta um perfil de tolerabilidade favorável.⁴⁴ Outros estudos estão em curso de modo a clarificar a necessidade de intensificação de dose do paclitaxel nestas doentes.³

O padrão de metastização intra-abdominal, característico do CEO, levou ao desenvolvimento de esquemas de quimioterapia de administração intra-peritoneal (IP). Os resultados do estudo GOG 172 mostraram que a quimioterapia IP, em associação com a quimioterapia endovenosa, estava associada com maior sobrevivência global nas doentes com CEO sujeitas a cirurgia de cito-redução óptima, quando comparada com a quimioterapia endovenosa apenas (sobrevivência mediana de 65,6 meses *versus* 49,7 meses e redução do risco de morte de 21,6%).⁴⁵ Contudo, o estudo levantou dúvidas em relação ao perfil de toxicidade e tolerabilidade da quimioterapia IP, visto que apenas 42% das doentes do ramo experimental conseguiram completar o tratamento.⁴⁵

Até à data, nenhuma outra associação de dupletos ou tripletos na quimioterapia adjuvante, ou de monoterapia na quimioterapia de manutenção, mostraram benefício em relação à associação clássica da carboplatina com o paclitaxel, nas doentes com CEO.³

C. Tratamento da recidiva ou persistência de doença

Muitas das doentes com CEO eventualmente acabam por apresentar recidiva ou progressão da doença. O padrão de recorrência e metastização, com predomínio das formas intra-abdominais, tem levado à formulação de várias teorias (e.g. teoria das células tumorais estaminais).⁴⁶ O tratamento adequado nestas situações depende do período de tempo passado até à recorrência da doença, da sua natureza, e dos esquemas de quimioterapia anteriormente utilizados.

As doentes cujo intervalo de tempo até apresentarem progressão de doença, após quimioterapia baseada em platinos, é superior a 6 meses são consideradas platino-sensíveis e têm uma grande probabilidade de voltarem a responder ao mesmo tipo de esquema de quimioterapia.³ A escolha entre a carboplatina e a cisplatina deve ter em consideração o agente previamente utilizado, a sua tolerabilidade e toxicidade residual.³ As doentes com recidiva ou progressão de doença entre os 6 e 12 meses após o término da quimioterapia de 1ª linha apresentam um risco aumentado de desenvolverem neurotoxicidade significativa quando tratadas com o mesmo esquema, essencialmente pela neurotoxicidade acumulada da carboplatina e do paclitaxel.³ No sentido de tentar minimizar este efeito, outras combinações de agentes de quimioterapia foram estudadas (e.g. carboplatina e gemcitabina⁴⁷, carboplatina e dorrubicina lipossómica peguilada⁴⁸, doxorrubicina lipossómica peguilada e trabectedina⁴⁹), tendo demonstrado eficácia não inferior ao esquema habitualmente utilizado (i.e. carboplatina e paclitaxel), com melhor perfil de tolerabilidade, pelo que a sua utilização neste grupo de doentes foi aprovada pela EMA (*European Medicines Agency*).³ As doentes com um período de tempo livre de doença prolongado (i.e. superior a 24 meses) beneficiam com cirurgia de cito-redução secundária, especialmente se a recidiva for isolada e se a sua condição clínica for boa, com sobrevivência global mediana após a recidiva de 30,3 meses (por cada aumento de 10% na proporção de doentes submetidos a cirurgia de cito-redução secundária completa verificou-se um ganho de 3 meses na sobrevivência global mediana, $p = 0,019$).⁵⁰

As doentes com CEO platino-refractário (i.e. com progressão de doença durante o tratamento de quimioterapia baseada em platinos) ou platino-resistente (i.e. com progressão de doença nos primeiros 6 meses após o final do tratamento com quimioterapia baseada em platinos) geralmente apresentam baixas taxas de resposta à quimioterapia de 2ª linha, e curta sobrevivência global.³ As taxas de resposta à utilização de outros esquemas de quimioterapia (e.g. doxorrubicina lipossómica, topotecano, gemcitabina, ifosfamida), são de cerca de 10%.³ As doentes com boa condição clínica, motivadas a receber outros tratamentos, beneficiam em participar em ensaios clínicos.³ Actualmente estão em curso vários ensaios clínicos na tentativa de testar novos agentes de quimioterapia (e.g. inibidores da *Poly(ADP)-Ribose Polymerase*, como o olaparib⁵¹), terapêuticas alvo (e.g. bevacizumab [anticorpo monoclonal anti-VEGF]⁵² e farletuzumab [anticorpo monoclonal anti-receptor dos folatos]⁵³), e terapêuticas imunológicas (e.g. terapêuticas imunomodeladoras, como o ipilumimab [anticorpo anti-CTLA-4]⁵⁴, e vacinas, como a vacina anti-idiotipo ACA-125⁵⁵).

1.2. Inflamação e cancro: o papel da interleucina 8

A interleucina 8 (IL-8), ou CXCL8, é uma pequena molécula de 8kDa pertencente à família das quimiocinas.⁵⁶⁻⁵⁸ O gene da *IL-8* localiza-se no braço longo do cromossoma 4 (4q13-21, figura 2) e a sua transcrição codifica uma proteína de 99 amino-ácidos que depois é processada de modo a dar origem a uma proteína competente, de 72 amino-ácidos nos monócitos e macrófagos, e de 77 amino-ácidos nas células não imunológicas.⁵⁸

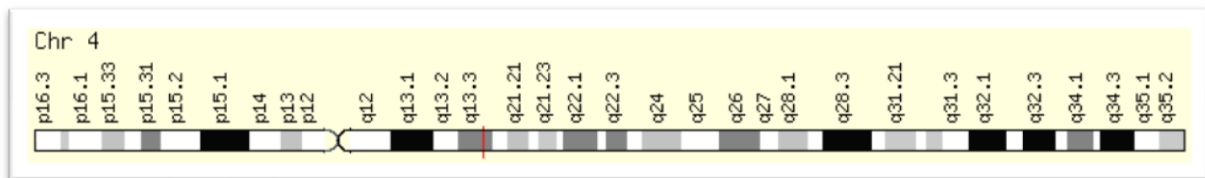


Figura 2. Localização do gene da *IL-8* no cromossoma 4 (4q13-21). Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov

A expressão desta quimiocina é regulada por vários tipos de estímulos diferentes, como sinais inflamatórios (e.g. IL-1 β e factor de necrose tumoral α), *stress* ambiental e químico (e.g. hipóxia celular e exposição a agentes citotóxicos), e hormonas esteróides (e.g. androgéneos, estrogéneos e dexametasona), podendo ser secretada por vários tipos de células diferentes (e.g. monócitos, neutrófilos, células endoteliais, células mesenquimatosas e células tumorais).⁵⁶⁻⁶⁰

Os efeitos biológicos da IL-8 são mediados através da ligação da IL-8 a dois receptores da superfície da membrana celular acoplados à proteína G (CXCR1 e CXCR2, figura 3).⁵⁸ Estes receptores, depois de activados, transmitem potentes sinais reguladores da transcrição de vários factores nucleares, promovendo a proliferação celular, angiogénese (através da estimulação da transcrição de factores como o factor de crescimento do endotélio vascular, VEGF), migração celular, sobrevivência e inibição da apoptose celulares (e.g. através do aumento da *bcl2* e diminuição da *bax*).^{58,61-63}

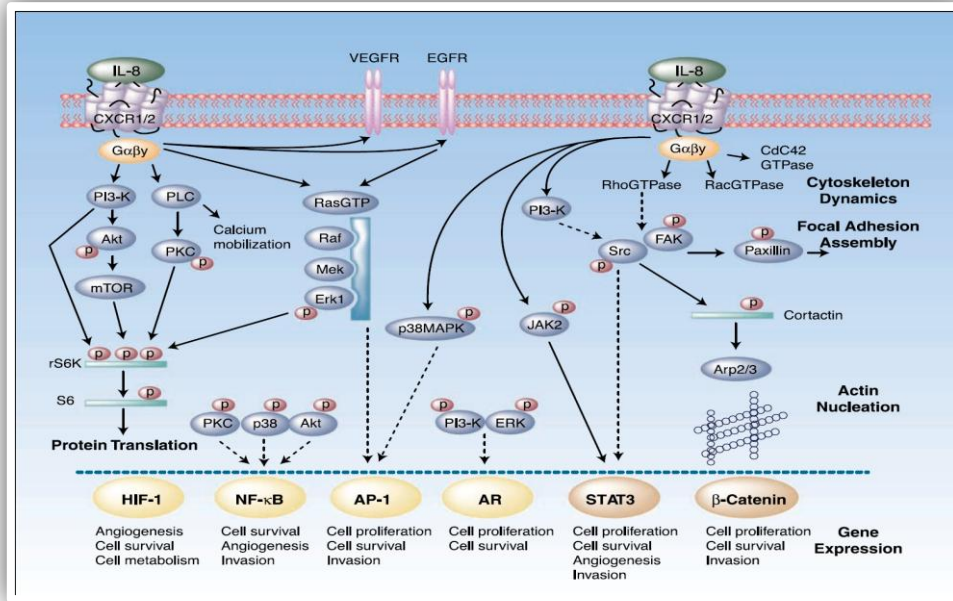


Figura 3. Vias de sinalização celular ativadas pela IL-8 através dos receptores CXCR1 e CXCR2. Figura extraída a partir do *Clinical Cancer Research* 14, pág. 6736 (2008)⁵⁸

Vários estudos têm demonstrado a sobre-expressão da IL-8 pelas células tumorais, incluindo as células tumorais do CEO, induzida frequentemente por intervenções terapêuticas (e.g. quimioterapia) e *stress* ambiental (e.g. hipoxia tumoral).^{58,61,64-66}

A síntese e secreção aumentadas da IL-8 pelas células tumorais representam um grande impacto no microambiente tumoral, já que os receptores CXCR1 e CXCR2 são expressos não só pelas células tumorais, como também pelas células endoteliais, neutrófilos e macrófagos associados ao tumor.⁵⁸ Assim sendo, a secreção de IL-8 a partir das células tumorais aumenta a sua capacidade de proliferação e a sobrevivência através de vias de sinalização autócrina^{58,61,66} e, para além disso, activa as células endoteliais da vasculatura tumoral, promovendo a angiogénese, e induz a infiltração quimiotática de neutrófilos para o local do tumor, estimulando a secreção de factores de crescimento adicionais (pelos neutrófilos e pelos macrófagos associados ao tumor), o que, por sua vez, aumenta ainda mais a capacidade proliferativa e invasiva das células tumorais (figura 4).^{58,61-63,67-69}

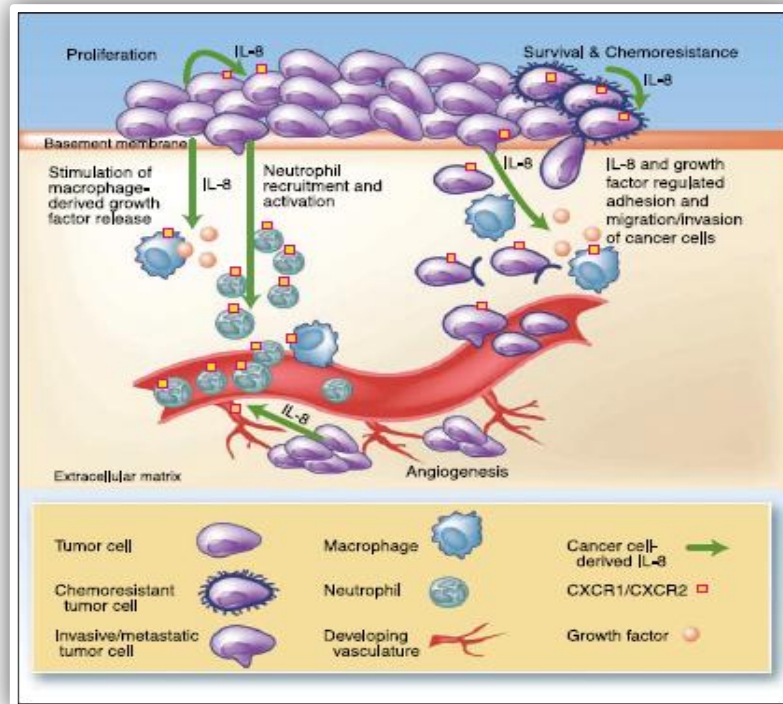


Figura 4. Influência da IL-8 no microambiente tumoral.

Figura extraída a partir do *Clinical Cancer Research* 14, pág. 6737 (2008)⁵⁸

A IL-8 é um mediador pró-angiogénico potente, cuja acção parece ser independente do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF).^{61,62,64,68,70}

Mizukami *et al*⁷¹ comprovaram que em linhas celulares de cancro do cólon deficientes em factor induzido pela hipoxia 1 α (HIF1 α), DLD-1 (HIF-kd), essencial para a expressão do VEGF (*vide infra* figura 5), a indução da expressão da IL-8 pela hipóxia era mantida (e até estimulada, se activação do oncogene *K-RAS*), e sucedia através da produção de peróxido de hidrogéneo, que por sua vez activava factores de transcrição nuclear (NF- κ B), verificando-se, assim, a manutenção da resposta angiogénica no microambiente tumoral.⁷¹

A sobre-expressão da IL-8 é um factor de prognóstico independente no CEO, já que níveis aumentados no tecido tumoral, soro e ascite de doentes com CEO estão associados a estágio avançado, alto grau tumoral, menor sobrevivência livre de doença e menor sobrevivência global.^{65,68,69,72-75}

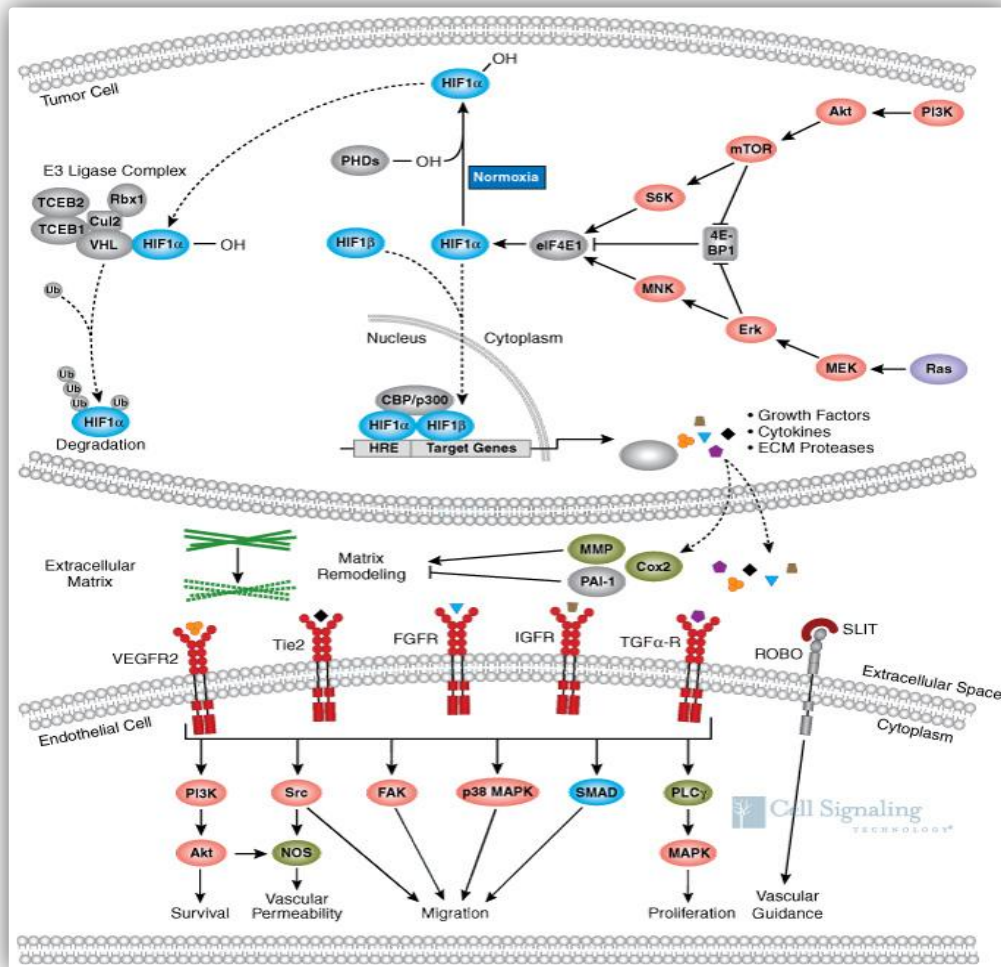


Figura 5. Mecanismos de angiogênese induzidos pela hipóxia tumoral.

Figura extraída de *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13, 29-37 (2002)

A hipóxia tumoral é um factor extremamente importante na indução da produção do VEGF. O seu efeito é mediado pela transcrição do HIF-1 α e HIF-2 α .⁷⁶⁻⁷⁸ Na presença de oxigénio (normóxia), o HIF-1 α é rapidamente degradado pelo proteossoma. Na ausência de oxigénio (hipóxia), o HIF-1 α não sofre hidroxilação o que impede a sua subsequente ligação ao factor de *Von Hippel-Lindau* (VHL) e subsequente degradação por ubiquitinação. Após estabilização pela hipóxia, o HIF-1 α é translocado para o núcleo onde forma heterodímeros com o HIF-1 β . Estes ligam-se a elementos de resposta à hipóxia (HRE), levando à transcrição e activação de vários factores importantes para a sobrevivência celular durante a hipóxia. A actividade do HIF-1 α também pode ser regulada de uma forma independente do oxigénio, através de vias de activação como fosfatidilinositol-3-cínase e *mitogen-activating-protein* (MAP) cínase.⁷⁶⁻⁷⁸ A hipóxia tumoral relaciona-se com aumento da resistência aos tratamentos de quimioterapia e radioterapia⁷⁹⁻⁸³ e, em muitos casos, com a progressão tumoral (metastização)⁸⁴ e menor sobrevivência⁸⁵.

A sobre-expressão da IL-8 também poderá ser um factor preditivo de quimio-resistência (*vide supra* figura 4).⁶⁵

Estudos em modelos animais demonstraram que os agentes destabilizadores dos polímeros dos microtúbulos (e.g. taxanos e alcalóides da vinca) também apresentam actividade anti-angiogénica, através da inibição da síntese do HIF-1 α (efeito dose-dependente, atingindo tanto as células tumorais como as células do endotélio).⁸⁶⁻⁹⁰ Merritt *et al*⁶⁵ testaram o efeito do silenciamento do gene da IL-8 em termos de resposta à quimioterapia baseada em taxanos, em murinos com células tumorais de CEO taxano-sensíveis e taxano-resistentes. Verificaram que o silenciamento da IL-8, em combinação com a quimioterapia baseada em taxanos, reduzia o tamanho do tumor, não só nos murinos taxano-sensíveis, como também nos murinos taxano-resistentes.⁶⁵ Assim sendo, a IL-8 poderia ser um potencial alvo terapêutico com bastante interesse.

1.3. Polimorfismos genéticos e cancro: o polimorfismo da *IL-8 -251 T/A*

Os polimorfismos genéticos são variações do ADN, existentes nos indivíduos de uma população, cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1% dessa população.⁹¹ A maioria dos polimorfismos conhecidos ocorre em genes envolvidos no controlo da proliferação e diferenciação celulares, reparação de ADN, e manutenção da integridade do genoma, bem como em genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de diferentes xenobióticos e em genes importantes na regulação do sistema imunológico.⁹² Os polimorfismos mais comuns são caracterizados pela alteração de apenas um nucleotídeo na sequência do ADN, e designam-se por *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs).^{92,93} Os SNPs são a principal fonte de variabilidade individual, conferindo a cada indivíduo um património genético único.⁹² No entanto, a distribuição da frequência dos SNPs apresenta variações, tanto dentro da uma mesma população, como inter-populacionais.⁹² Tendo em conta que o risco para o desenvolvimento de cancro parece ser influenciado pelos padrões dos SNPs que cada indivíduo possui, o estudo destes polimorfismos, em determinados genes alvo, poderá ajudar a definir grupos de risco para o desenvolvimento de cancro, assim como identificar padrões com influência no prognóstico e na resposta e toxicidade aos tratamentos anti-neoplásicos.⁹³

Polimorfismo da IL8 -251 T/A

Descrito no ano 2000 por Hull *et al*⁹⁴, o polimorfismo da *IL-8 -251 T/A* é um SNP que se caracteriza pela substituição da timina (T) pela adenina (A) na posição nucleotídica 251 da região promotora do gene da IL-8 (rs4073).^{94,95} Este polimorfismo funcional correlaciona-se com a expressão de níveis mais elevados da proteína IL-8 nos indivíduos com pelo menos um alelo A, em comparação com os indivíduos com o genótipo T/T.^{70,94} Segundo os estudos realizados com este SNP, a frequência do alelo A na população pode variar entre 30% e 50% (dependendo da etnia da população em estudo).⁹⁶ O alelo A tem sido relacionado com um aumento do risco e agressividade de vários tipos de cancro (e.g. carcinoma da nasofaringe⁹⁷, adenocarcinoma gástrico^{98,99}, carcinoma da mama¹⁰⁰⁻¹⁰², adenocarcinoma da próstata¹⁰³ e carcinoma colo-rectal^{104,105}), apesar de este ser ainda um facto contraditório¹⁰⁶.

EM 2005, Anne Shultheis *et al*⁷⁰ descreveram este polimorfismo numa amostra de 53 doentes com CEO (distribuição genotípica: A/A = 24,6%, A/T = 49%, T/T = 26,4%), verificando que a presença do alelo A se relacionava com uma menor taxa de resposta à quimioterapia metronómica com ciclofosfamida e bevacizumab (taxas de resposta: A/A = 0,0%, A/T = 19%, T/T = 50%; $p < 0,006$), e tendência para menor sobrevivência livre de progressão nas doentes com genótipo A/T, apesar das diferenças encontradas não serem estatisticamente significativas (genótipo A/A [referência]: RR=1, genótipo A/T: RR=1,59 [IC95%: 0,77-3,29], genótipo T/T: RR=0,75 [IC95%: 0,32-1,73]; $p = 0,093$).⁷⁰

Não existem outros estudos com este SNP no CEO, que seja do nosso conhecimento. Este estudo pretende avaliar a influência do SNP -251 T/A do gene da *IL-8* no prognóstico e resposta à quimioterapia de doentes com CEO.

Objetivos

2. Objectivos do estudo

2.1. Objectivo principal

Avaliar a influência do polimorfismo -251 T/A da *IL-8* na sobrevivência global, sobrevivência livre de progressão, e resposta à quimioterapia baseada em platinos (e.g. carboplatina e paclitaxel, cisplatina e paclitaxel), em doentes com CEO.

2.1. Objectivo secundário

Avaliar a incidência do polimorfismo -251 T/A da *IL-8* em doentes com CEO e relacioná-lo com factores de prognóstico conhecidos (i.e. idade, estágio, subtipo histológico, grau histológico e volume de doença residual), tipo de recidiva (i.e. subida isolada do valor do CA 125, recidiva local, recidiva à distância, ou recidiva local e à distância), tempo de resposta sustentada e aparecimento de resistência à quimioterapia baseada em platinos, assim como na resposta e resistência aos diferentes tipos de quimioterapia utilizadas após o aparecimento de doença platino-resistente (e.g. doxorubicina).

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Desenho do estudo

Desenhou-se um estudo de coorte retrospectivo com recurso a análise dos polimorfismos do gene da *IL-8 -251 T/A (rs4073)* em amostras de ADN crioconservadas obtidas a partir de sangue periférico de doentes com CEO admitidas no IPO Porto. As amostras de ADN foram processadas no mesmo dia da colheita do sangue periférico. As colheitas de sangue periférico foram efectuadas entre 05 de Janeiro de 1996 e 22 de Dezembro de 2010, independentemente da fase de seguimento das doentes (se as doentes estavam em tratamento de quimioterapia, as colheitas de sangue eram efectuadas no 1º dia do ciclo).

3.2. Participantes

Os critérios de inclusão englobavam as doentes com diagnóstico histológico confirmado de CEO, em qualquer estágio de doença, admitidas para tratamento e seguimento no IPO Porto. Foram excluídas da análise as doentes submetidas a esquemas de quimioterapia de 1ª linha diferentes da associação platino-taxano (e.g. ciclofosfamida em associação com cisplatina), de modo a homogeneizar a amostra e facilitar a posterior leitura dos resultados, e as doentes que tiveram alta do IPO Porto imediatamente após terminarem os tratamentos de 1ª linha (e.g. doentes seguidas noutras instituições que, ao abrigo de protocolos com o IPO Porto, foram admitidas apenas para efectuar tratamentos não disponíveis nos hospitais de origem). As doentes foram tratadas e seguidas de acordo com os protocolos da Clínica de Ginecologia do IPO Porto, entre 05 de Janeiro de 1996 e 22 de Abril de 2011.

3.3. Variáveis em estudo

O grupo de doentes exposto foi definido pela presença dos genótipos -251 A/A e A/T da *IL-8* e o grupo de doentes não exposto pela presença do genótipo -251 T/T da *IL-8*.

Foram definidos como factores de prognóstico: idade, estágio, subtipo histológico, grau histológico e volume de doença residual. A sobrevivência global foi definida como o período de tempo entre a data de diagnóstico e a data da morte ou a data do último contacto (se doente viva), considerando-se aquele que ocorrer primeiro. A sobrevivência livre de progressão foi definida como o período de tempo entre a data de diagnóstico e a data de primeira recidiva (ou progressão de doença), ou data da morte, ou data do último contacto com a doente (se doente viva e sem evidência de recidiva ou progressão de doença), considerando-se aquele que ocorrer primeiro. A análise da relação dos polimorfismos genéticos da *IL-8*, conforme definidos nos grupos em estudo, e sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão foram ajustados para os factores de prognóstico considerados (eventuais factores de confusão).

A resposta aos tratamentos efectuados foi avaliada segundo critérios imagiológicos (RECIST¹⁰⁷) e serológicos (critérios de Rustin¹⁰⁸) – tabela 5.

O tempo de resposta sustentada foi definido como o período de tempo entre a data do último ciclo de quimioterapia e a data da primeira recidiva (ou progressão de doença), ou a data de morte ou a data do último contacto (no caso de doente viva e sem evidência de recidiva ou progressão de doença), considerando-se aquele que ocorrer primeiro.

A resistência foi definida como a ocorrência de recidiva ou progressão de doença em menos de 6 meses após a data do último ciclo de quimioterapia.

Definiu-se como recidiva local a recidiva ou progressão de doença em localização pélvica, peritoneal ou em gânglios regionais, e como recidiva à distância a recidiva ou progressão de doença em outras localizações que não as definidas como recidiva local. A recidiva local e à distância compreendia os casos com recidiva ou progressão de doença local e à distância, simultaneamente. A subida isolada do CA 125, sem doença mensurável, foi definida como recidiva isolada do CA 125.

A presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 foi considerada como eventual factor de confusão na avaliação da resposta, tempo de resposta e resistência à quimioterapia. A análise destes dados também foi ajustada conforme os factores de prognóstico considerados no estudo, o número de co-morbilidades e o ECOG.

Tabela 5. Avaliação da resposta segundo os critérios de RECIST¹⁰⁷ e de Rustin¹⁰⁸

Tipo de resposta	Crítérios RECIST	Crítérios de Rustin*
Resposta completa	Desaparecimento de todas as lesões alvo; qualquer gânglio patológico identificado deve ter redução do seu eixo curto para < 10mm	Redução do valor do CA 125 > 50% do valor basal em duas amostras (espaçadas por um período ≥ 28 dias) e normalização do valor
Resposta parcial	Diminuição de pelo menos 30% da soma dos diâmetros das lesões alvo (tendo como referência a soma das lesões alvo basal)	Redução do valor do CA 125 > 50% do valor basal em duas amostras (espaçadas por um período ≥ 28 dias), mas sem normalização do valor
Doença estável	Sem diminuição nem aumento da soma das lesões alvo suficiente para poder definir como resposta parcial ou progressão de doença	Redução do valor do CA 125 < 50% do valor basal em duas amostras (espaçadas por um período ≥ 28 dias)
Progressão de doença	Aumento de pelo menos 20% da soma dos diâmetros das lesões alvo (em comparação com a soma das lesões alvo basal, o aumento absoluto da soma deve ser > 5mm), ou aparecimento de uma ou mais lesões alvo de novo.	Aumento do valor do CA 125 > 20% em relação ao valor basal ou duplicação do valor do CA 125 em relação ao valor mais baixo documentado (<i>nadir</i>), em 2 amostras espaçadas por um período ≤ 7 dias.

* O valor basal do CA 125 deve ser, pelo menos, duas vezes superior ao valor de referência do laboratório.

3.4. Material e métodos laboratoriais

3.4.1. Processamento das amostras

O ADN genómico utilizado no decorrer do trabalho experimental foi isolado a partir de células nucleadas de sangue periférico. O isolamento de ADN genómico foi efectuado segundo o *Kit* de extracção da Qiagen®, *QIAmp® DNA Blood Mini Kit*, (Qiagen® 51106) executando o procedimento laboratorial fornecido pelo fabricante.

3.3.2. Genotipagem do polimorfismo da *IL-8 -251 T/A (rs4073)*

A caracterização do polimorfismo em estudo foi efectuada recorrendo às técnicas de *polymorphism chain reaction – restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), tendo sido utilizadas as condições descritas na tabela 6.

Tabela 6.

Descrição do protocolo de PCR-RFLP utilizado para análise do polimorfismo da *IL-8 -251T/A*

Gene	Método	Sequência do <i>primer</i>	Enzima de restrição	Tempo de incubação	°C
IL – 8					
-251 T/A	PCR-RFLP	F- 5'- CCA TCA TGA TAG CAT CTG TA– 3' R- 5'- CCA CAA TTT GGT GAA TTA TTA A- 3'	<i>Ase I</i>	3 h	37

Para análise do polimorfismo *-251 A/T* no gene da *IL-8*, amplificou-se um fragmento de ADN por PCR com base no protocolo descrito por *Heinzmann et al.*⁹⁵

Submeteram-se a PCR cerca de 20ng de ADN de cada caso, o que corresponde a aproximadamente 2 µl de cada amostra.

O volume de reacção foi de 50 μ l, e a mistura de reacção incluiu: 5 μ l de tampão de reacção de PCR (1x), 1U de Taq ADN Polimerase, 2,5mM de MgCl₂ (*Go Taq®Flexi DNA Polymerase #M8305*), 0,2 mM de dNTPs (dinucleosídeos trifosfato) (*Fermentas, #R0192*) e 0,3 μ M de cada um dos *primers*.

As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: pré-desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 55 segundos a 57°C (emparelhamento) e 60 segundos a 72°C (extensão), aos quais se seguiu um passo final de extensão a 72°C durante 8 minutos. A reacção foi efectuada num termociclador programável BioRad®.

Para confirmar a correcta amplificação dos fragmentos de ADN obtidos e o seu respectivo peso molecular (173 pb), analisaram-se 15 μ l do produto de PCR por electroforese em gel de agarose a 1.5% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 μ g/ml). Os géis foram preparados em tampão TBE (TBE 10X: Tris Base 108 g/L [Merck 1083821000], Ácido Bórico 55 g/L [Merck 1001651000], EDTA 6,72 g/L [Sigma E-1644]), sendo este também utilizado como tampão de electroforese. As amostras foram aplicadas no gel e foi utilizado um marcador molecular de 100pb (*Fermentas #SM0243*). A visualização dos géis foi efectuada recorrendo a um transiluminador Gel DocXR, BioRad.® (figura 6).

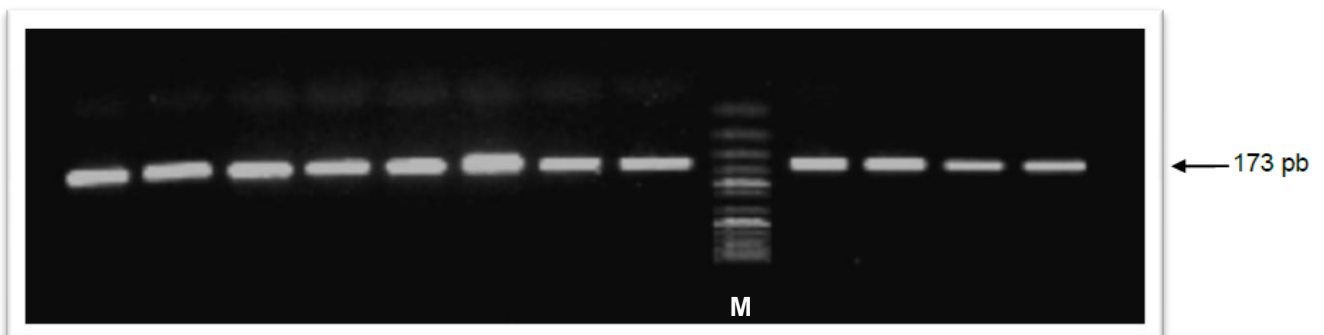


Figura 6. Gel de agarose a 1,5 % (p/v), mostrando a banda de 173 pb que corresponde à região do gene da *IL-8 -251 T/A (rs7043)* amplificado por PCR (M – marcador de 50 pb).

Para a análise do polimorfismo do gene da *IL-8* foram utilizados 10 μ L de produto de PCR de cada amostra para a restrição com a endonuclease *AseI* (*New England Biolabs®*, R0526S), num volume final de reacção de 15 μ L.

As amostras foram incubadas a 37 °C, durante 3 horas.

O resultado da digestão do fragmento amplificado do gene da IL-8 contendo o locus de interesse foi observado por electroforese em gel de agarose a 2% (p/v), corado com brometo de etídeo (10µg/mL). A digestão do fragmento do gene *IL-8* resultava em 3 padrões de bandas, permitindo identificar os diferentes genótipos do polimorfismo -251 T/A: padrão 1 – bandas de 152pb e de 21pb (não é possível de visualizar o fragmento de 21pb), correspondente ao genótipo AA; padrão 2 – banda de 173 pb, corresponde ao genótipo TT; e padrão 3 – padrão de duas bandas, de pesos moleculares de 173pb, 152pb e 21pb, correspondente ao genótipo AT (figura 7).

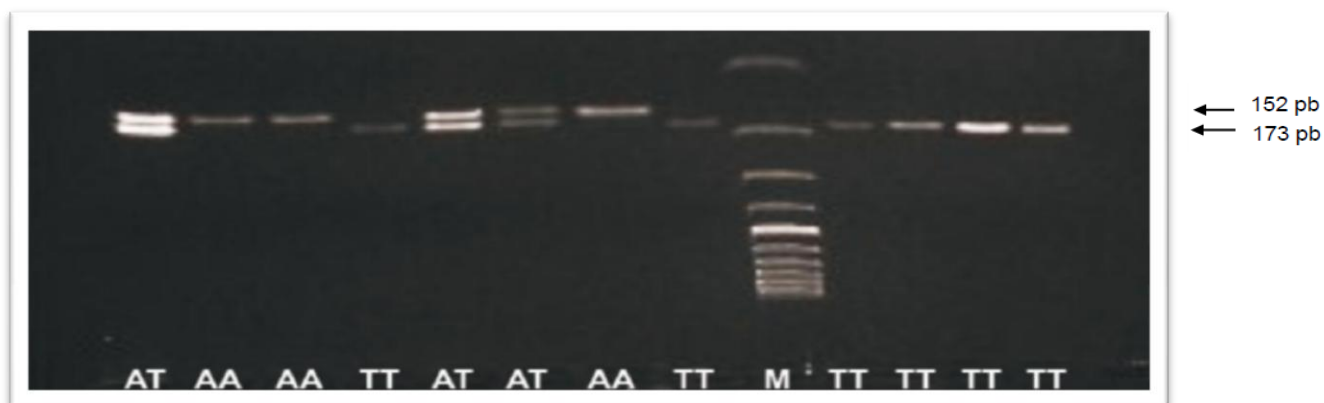


Figura 7. Gel de agarose a 2 % (p/v), após PCR- RFLP, observando-se os 3 genótipos possíveis do polimorfismo *IL-8 T-251 A* (M- marcador 100 pb).

3.5. Material e método de recolha de informação

A informação clínica foi recolhida a partir dos registos hospitalares constantes nos processos clínicos das doentes no IPO Porto, entre 01 de Março de 2010 e 22 de Abril de 2011 (data de encerramento do estudo e actualizações do estado das doentes à data do último contacto). Para tal, criou-se uma “folha de recolha de dados”. Este documento permitia que se efectuasse uma recolha rápida e sintética da informação clínica pretendida. Nele se definiam os conceitos subjacentes a cada elemento de ordem clínica recolhido (e.g. data de diagnóstico – *data de saída do 1º diagnóstico histológico* [...]), de modo que a recolha dos dados fosse a mais homogénea possível. Este documento também estava estruturado de modo a que a inserção dos dados recolhidos numa base informática fosse rápida, simples e eficiente (e.g. codificação numérica de variáveis dicotómicas [“gene BRCA1 mutado?” 0 – não, 1 – sim, 9 – sem informação] e de variáveis categóricas [“estádio FIGO” 1 – estágio IA, *tumor limitado a 1 ovário; cápsula intacta; superfície sem tumor; lavado peritoneal negativo*, [...], 9 – sem informação).

3.6. Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi efectuado através da fórmula $n = \frac{z^2 \cdot p(1-p)}{d^2}$ para cálculo do IC95% considerando uma incidência de CEO de 130² e uma proporção do genótipo A/A e A/T de 73,6%⁷⁰ (diferença de riscos de 2). Assim, concluiu-se ser necessária uma amostra com pelo menos 131 doentes para se obter um poder estatístico de 80% (cálculo efectuado com recurso ao software OpenEpi, versão 2.3.1: <http://www.openepi.com>).

3.7. Material e método de análise estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada através do programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences*, versão 18.0 (SPSS Inc., 2010). A análise de variáveis contínuas foi efectuada através de testes paramétricos (*one-way ANOVA test*), no caso da distribuição da variável ser normal (neste caso, o valor dos resultados é dado sob a forma de média), ou através de testes não paramétricos (*Mann-Whitney U Test*), no caso da distribuição da variável não ser normal (neste caso, o valor dos resultados é dado sob a forma de mediana). A normalidade das variáveis contínuas foi testada através do *Kolmogorov-Smirnov Test*. A análise das variáveis categóricas foi efectuada através do teste do qui-quadrado (χ^2) ou do teste exacto de *Fisher*, conforme apropriado. A análise multivariada foi efectuada através de testes de correlação (teste de *Spearman*). O cálculo de risco foi efectuado através do risco relativo (RR), para intervalos de confiança a 95% (IC95%). As curvas de sobrevivência foram obtidas através do método de *Kaplan-Meier* e comparadas através do teste de *Log-rank*. Para análise multivariada utilizou-se o método de regressão de *Cox*. O cálculo de risco foi efectuado através do *Hazard Ratio* (HR). Foram considerados estatisticamente significativos os valores de *p* inferiores a 0,05.

3.8. Questões éticas e financiamento

O estudo de polimorfismos genéticos foi aprovado pelo conselho de bioética do IPO Porto. As amostras de sangue periférico foram colhidas após a obtenção do consentimento livre e informado por parte das doentes, de acordo com a Declaração de Helsínquia. Os custos deste estudo foram suportados pelo Instituto de Ciência Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, através da disponibilização de $\frac{2}{3}$ do valor das propinas aplicados no 2^o ano do mestrado em oncologia pela candidata.

Resultados

4. Resultados

Entre 05 de Janeiro de 1996 e 22 de Dezembro de 2010 foram colhidas 382 amostras de sangue periférico referentes a 230 doentes com CEO admitidas no IPO Porto. Das 230 doentes revistas foram seleccionadas para análise 216. As 14 doentes que foram excluídas da análise não obedeciam aos critérios de selecção estabelecidos (13 doentes foram tratadas com um esquema de quimioterapia de 1ª linha diferente do considerado para análise e 1 doente teve alta do IPO Porto logo após terminar o tratamento, sendo orientada para seguimento para o hospital de origem – figura 8). Procedeu-se à genotipagem das amostras de ADN crioconservado disponíveis, referentes às 216 doentes seleccionadas, entre 27 de Abril de 2011 e 06 de Maio de 2011. Foi possível determinar o genótipo do polimorfismo da *IL-8 -251 T/A* em 162 doentes. Não se conseguiu amplificar as restantes amostras de ADN, referentes a 54 doentes. As amostras que não amplificaram tinham sido colhidas e processadas entre 30 de Maio de 1997 e 02 de Fevereiro de 2009.

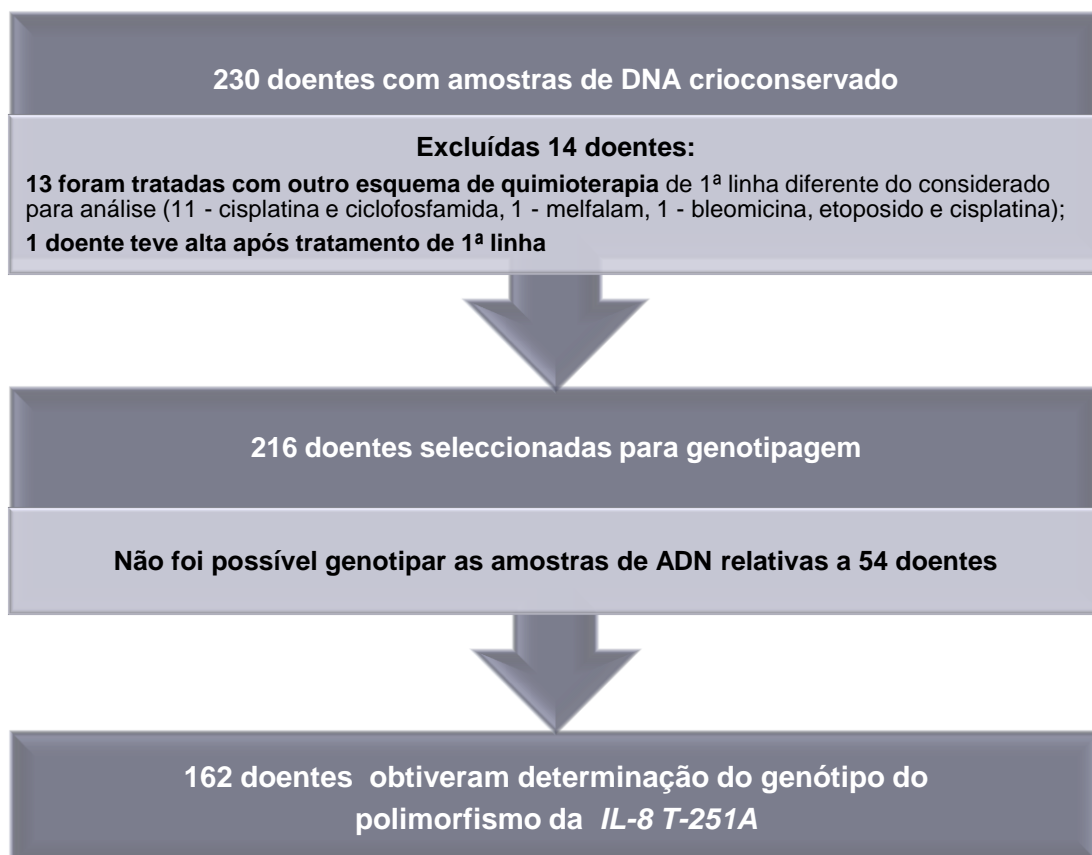


Figura 8. Diagrama de fluxo das doentes com CEO seleccionadas para análise do polimorfismo da *IL-8 -251 T/A*.

Nas 162 doentes estudadas, observou-se a seguinte distribuição genotípica do polimorfismo da *IL-8 -251 T/A*: genótipo TT em 82 doentes (50,6%), genótipo AT em 80 doentes (49,4%), e genótipo AA em 0 doentes (0%).

4.1. Análise da associação do polimorfismo genético da *IL-8 -251 T/A* com factores de prognóstico (clínicos e patológicos)

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo e: idade, subtipo histológico, grau histológico, e volume de doença residual após cirurgia. Verificou-se a existência de associação estatisticamente significativa entre os grupos em estudo e o estágio precoce (RR=2,063 [IC95%: 1,160-3,910], $p=0,029$) ou avançado (RR=0,485 [IC95%: 0,212-0,848], $p=0,029$), que se manteve após estudos de correlação ($p=0,029$). A tabela 7 mostra as características clínicas e patológicas consideradas na análise por grupos.

Tabela7. Análise estatística das características clínicas e patológicas dos grupos em estudo

Características N = 162	Genótipo AT N = 80	Genótipo TT N = 82	<i>p</i>	RR	IC95%
Idade (anos)*					
Média	53,8	54,98	0,543	-	-
Mínima	23	16			
Máxima	76	80			
Estádio – n (%)					
Precoce	36 (45%)	23 (28,4%)	0,029	2,063	1,160-3,910
FIGO IA	9 (11,3%)	6 (7,3%)			
FIGO IB	2 (2,5%)	0 (0,0%)			
FIGO IC	22 (27,5%)	17 (20,7%)			
FIGO IIA	3 (3,8%)	0 (0,0%)			
Avançado	44 (55%)	58 (71,6%)	0,029	0,485	0,212-0,848
FIGO IIB	1 (1,3%)	3 (3,7%)			
FIGO IIC	4 (5,0%)	0 (0,0%)			
FIGO IIIA	1 (1,3%)	0 (0,0%)			
FIGO IIIB	1 (1,3%)	4 (4,9%)			
FIGO IIIC	26 (32,5%)	37 (45,1%)			
FIGO IV	11 (13,8%)	14 (17,1%)			

Tabela 7.

Análise estatística das características clínicas e patológicas dos grupos em estudo (cont.)

Características N = 162	Genótipo AT N = 80	Genótipo TT N = 82	p	RR	IC95%
Subtipo histológico – n (%)					
Papilar-seroso	39 (48,8%)	46 (56,1%)	0,349	0,744	0,474-1,226
Mucinoso	13 (16,3%)	8 (9,8%)	0,219	1,795	0,701-4,598
Células claras	10 (12,5%)	8 (9,8%)	0,578	1,321	0,539-4,336
Endometrióide	5 (6,3%)	10 (12,2%)	0,192	0,480	0,256-1,473
Outros**	13 (16,3%)	10 (12,2%)	0,460	1,397	0,558-4,588
Grau histológico – n (%)					
Grau 1	18 (22,5%)	19 (23,2%)	0,919	0,963	0,462-2,005
Grau 2	15 (18,8%)	15 (18,3%)	0,940	1,031	0,466-2,278
Grau 3	19 (23,8%)	25 (30,5%)	0,335	0,710	0,351-1,546
Grau 4	2 (2,5%)	2 (2,4%)	0,980	1,026	0,141-7,463
ND	26 (32,5%)	21 (25,6%)	0,334	0,334	0,666-2,967
Volume de doença residual					
Sem doença residual	43 (53,8%)	32 (39%)	0,060	1,816	0,884-3,310
Doença residual ≤ 1cm	11 (13,8%)	19 (23,2%)	0,123	0,529	0,233-1,197
Doença residual > 1cm	12 (15%)	13 (15,9%)	0,880	0,937	0,399-2,198
Doença irressecável	13 (16,3%)	17 (20,7%)	0,463	0,463	0,334-1,649
ND	1 (1,3%)	1 (1,2%)	0,986	1,025	0,063-16,678

** Outros subtipos histológicos: histologias mistas, carcinomas de células de transição, carcinomas indiferenciados. ND – não definido.

4.2. Análise da associação do polimorfismo genético da *IL8 -251 T/A* com a sobrevivência

O tempo de seguimento nos dois grupos em estudo foi homogêneo, não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas (a mediana de tempo de seguimento foi de 73,86 meses, nas doentes com genótipo AT [variação de 1 a 177 meses], e de 63,85 meses, nas doentes com genótipo TT [variação de 5 a 164 meses]; $p = 0,178$).

4.2.1. Sobrevivência livre de progressão

Na análise efectuada da sobrevivência livre de progressão, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os grupos em estudo (figura 9).

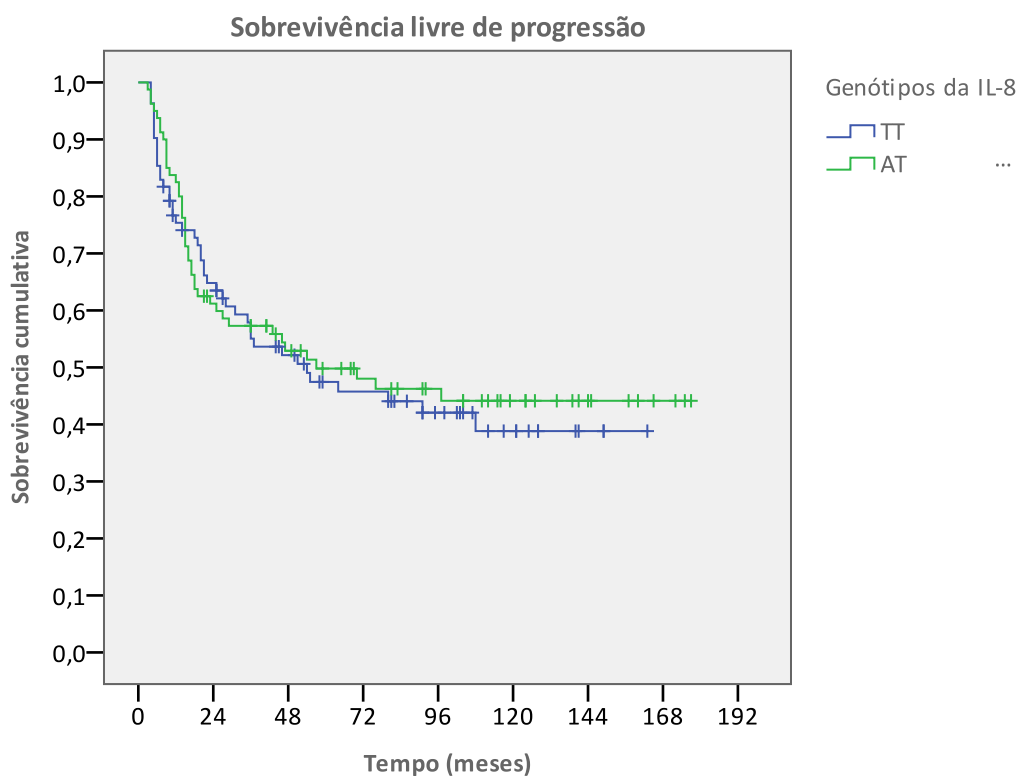


Figura 9. Sobrevivência livre de progressão.

Tempo mediano de sobrevivência livre de progressão: genótipo AT (n = 80) - 57,0 meses (IC95%: 5,0-109,0) genótipo TT (n = 82) - 54,0 meses (IC95%: 8,3-99,7); **p = 0,704**.

Sobrevivência livre de progressão aos 5 anos: genótipo AT – 49,8%; genótipo TT – 47,5%.

A análise estratificada destas curvas, segundo os grupos em estudo, mostrou diferenças na média de tempo da sobrevivência livre de progressão para as doentes com subtipo histológico de carcinoma de células claras, sem significado estatístico (genótipo AT (n=10): 159,6 meses [IC95%: 127,2-192,0], genótipo TT (n=8): 86,6 meses [IC95%: 41,0-132,1]; $p = 0,104$), e para as doentes com subtipo histológico de

carcinoma misto com componente de mau prognóstico, também sem significado estatístico (genótipo AT (n=6): - [sem eventos], genótipo TT (n=7): 46 meses [variação entre 18 e 46 meses]; $p = 0,055$).

A mesma análise, efectuada para as doentes com carcinoma de células claras e carcinoma misto com componente de mau prognóstico, em conjunto, mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em estudo (figura 10).

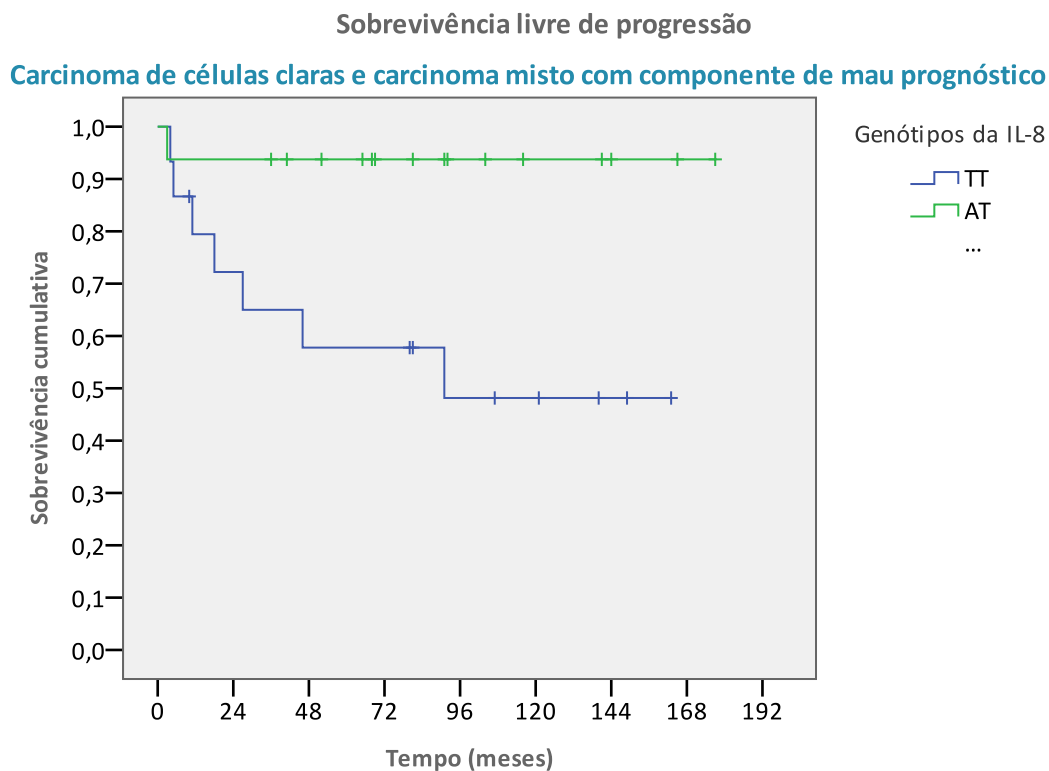


Figura 10. Sobrevivência livre de progressão nas doentes com carcinoma de células claras e carcinoma misto com componente de mau prognóstico.

Tempo médio de sobrevivência livre de progressão: genótipo AT (n=16) - 166,1 meses [IC95%: 145,5-186,8]; genótipo TT (n=15) - 95,2 meses [IC95%: 58,7-131,7]; $p = 0,015$.

Sobrevivência livre de progressão aos 5 anos: genótipo AT – 93,8%; genótipo TT – 57,8%.

Esta diferença manteve-se estatisticamente significativa após análise multivariada, tendo em consideração os outros factores de prognóstico, clínicos e patológicos, considerados neste estudo (HR = 2,128, $p = 0,048$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise estratificada da sobrevivência livre de progressão, segundo os grupos em estudo, para os outros factores de prognóstico, clínicos e patológicos (i.e. idade, estágio, grau histológico e volume de doença residual após cirurgia).

4.2.2. Sobrevivência global

A análise da sobrevivência global não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em estudo (figura 11).

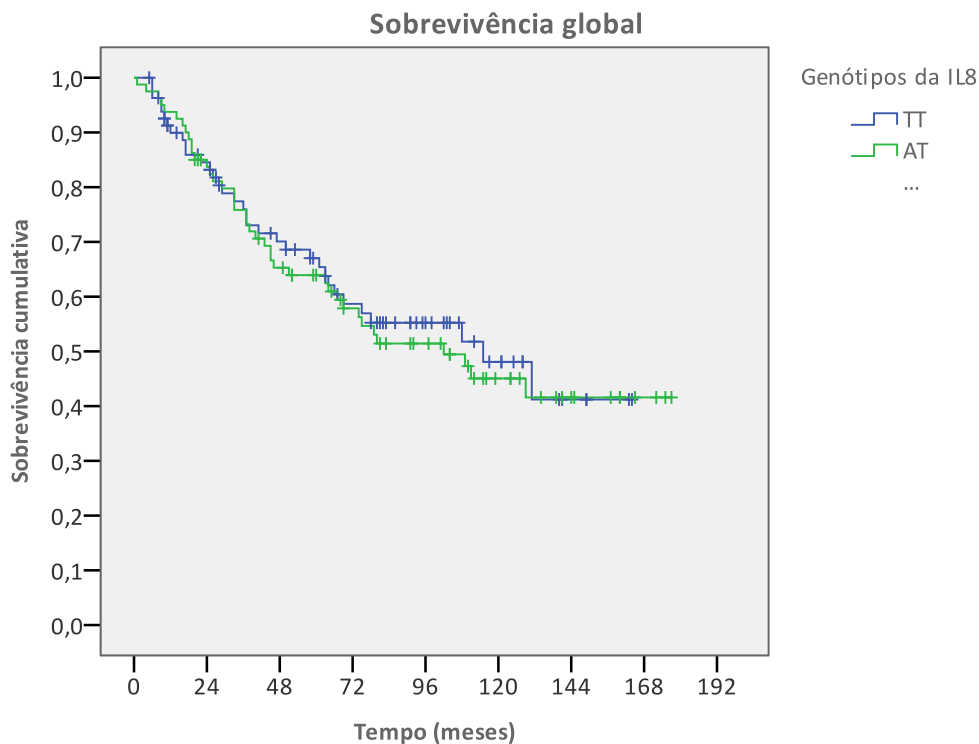


Figura 11. Sobrevivência global.

Tempo mediano de sobrevivência: genótipo AT (n=80) - 102,0 meses (IC95%: 57,8-146,2), genótipo TT (n=82) - 115,0 meses (IC95%: 62,2-167,8); $p = 0,774$.

Sobrevivência aos 5 anos: genótipo AT - 67%, genótipo TT - 67%.

Sobrevivência aos 10 anos: genótipo AT - 51,4%, genótipo TT - 48,1%.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise estratificada da sobrevivência global, segundo os grupos em estudo, para os outros factores de prognóstico, clínicos e patológicos (i.e. idade, estágio, subtipo histológico, grau histológico e volume de doença residual após cirurgia).

A figura 12 mostra a sobrevivência global para as doentes com carcinoma de células claras e carcinoma misto com componente de mau prognóstico, segundo os grupos em estudo.

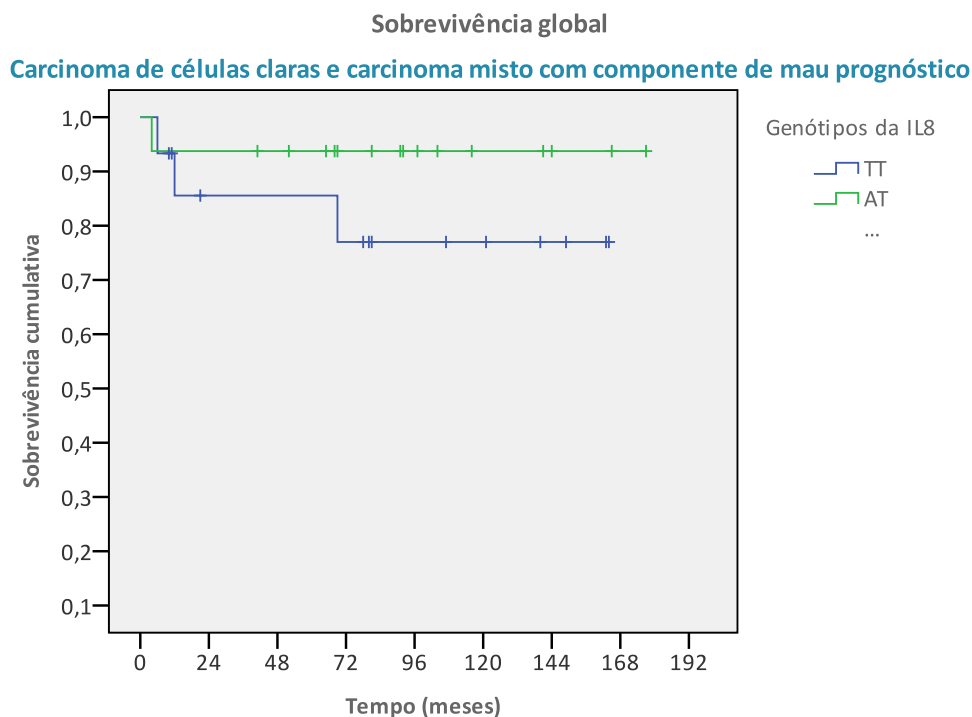


Figura 12. Sobrevivência global das doentes com carcinoma de células claras e carcinoma misto com componente de mau prognóstico, segundo os grupos em estudo.

Tempo médio de sobrevivência global: genótipo AT (n=16) - 166,2 meses [IC95%: 145,7-186,7]; genótipo TT (n=15) - 133,5 meses [IC95%: 102,6-164,5]; $p = 0,272$.

Sobrevivência livre de progressão aos 5 anos: genótipo AT - 93,8%; genótipo TT - 85,6%.

Sobrevivência livre de progressão aos 10 anos: genótipo AT - 93,8%; genótipo TT - 77,0%.

4.3. Análise da associação do polimorfismo genético da *IL-8 -251 T/A* com a eficácia dos tratamentos efectuados

As doentes foram tratadas de acordo com as normas internacionais de tratamento *standard* e os protocolos de tratamento utilizados estavam equilibrados entre os dois grupos.

4.3.1. Estádios precoces (FIGO IA a IIA)

O tratamento de 1ª linha para as doentes em estágio precoce, segundo os grupos em estudo, consistiu na cirurgia seguida de 6 ciclos de quimioterapia (tabela 8).

Tabela 8.

Análise estatística dos tratamentos efectuados, e sua resposta, nos grupos em estudo

Variáveis	Genótipo AT	Genótipo TT	<i>p</i>
N = 59	N = 36	N = 23	
Cirurgia			0,250
Ótima, sem doença residual	34 (94,4%)	23 (100%)	
Sub-ótima, doença residual < 1cm	2 (5,6%)	0 (0%)	
Quimioterapia*			0,250
Cisplatina+Paclitaxel	27 (75%)	14 (60,9%)	
Carboplatina+Paclitaxel	9 (25%)	9 (39,1%)	
Resposta (RECIST)			0,420
Completa	35 (97,2%)	23 (100%)	
Progressão	1 (36%)	0 (0%)	
Resposta (Rustin)			0,521
Completa	19 (52,8%)	10 (43,5%)	
Parcial	1 (2,8%)	0 (0%)	
NA	16 (44,4%)	13 (65,5%)	

* O protocolo de quimioterapia com cisplatina e paclitaxel foi utilizado até 20 de Maio de 2003. A partir desta data, o protocolo de quimioterapia utilizado foi com carboplatina e paclitaxel. NA: não aplicável.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação à resposta aos tratamentos efectuados entre os dois grupos. As doentes em estágio precoce tinham um bom estado geral (ECOG ≤ 1 em todas as doentes [$p = 0,313$]; número de co-morbilidades = 0 em todas as doentes [$p = 0,933$]). Apenas uma doente apresentava mutação num dos genes BRCA (mutação do gene BRCA1 numa doente com genótipo AT).

Documentaram-se diferenças estatisticamente significativas na frequência de recidivas, após tratamento de 1ª linha, entre os grupos em estudo (genótipo AT [n=36]: 9 recidivas [25%], genótipo TT [n=23]: 1 recidiva [4,3%]; RR = 7,333 [IC95%: *não foi possível calcular*]; $p = 0,039$), que se manteve nos testes de correlação ($p = 0,040$) (tabela 9).

Tabela 9. Caracterização da recidiva, após tratamento de 1ª linha, nos grupos em estudo

Características N=59	Genótipo AT N=36	Genótipo TT N=23	P	RR	IC95%	Correlação
Recidiva	9 (25%)	1 (4,3%)	0,039	7,333	-	0,040
Local	7 (19,4%)	1 (4,3%)	0,598	-	-	-
Local e à distância	1 (2,8%)	0 (0%)	0,725	-	-	-
Distância	1 (2,8%)	0 (0%)	0,725	-	-	-

O tempo de recidiva foi inferior a 6 meses em 1 das doentes que recidivaram após tratamento de 1ª linha, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo (genótipo AT [n=9]: 1 [11,1%], genótipo TT [n=1]: 0 [0%], $p = 0,845$).

O desenvolvimento de doença platino-resistente foi observado em 60% das doentes, sem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em estudo (genótipo AT [n=9]: 5 [55,6%], genótipo TT [n=1]: 1 [100%], $p = 0,389$).

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas no número de linhas de quimioterapia efectuadas antes do desenvolvimento de doença platino-resistente (genótipo AT [n=5]: 1,8 linhas [variação entre 1 e 2 linhas], genótipo TT [n=1]: 2 linhas; $p = 0,704$). O tempo médio para desenvolvimento de resistência foi de 1 mês

para a doente com genótipo TT e de 1,6 meses para as doentes com genótipo AT (variação entre 0 e 4 meses), $p = 0,815$.

Os protocolos de quimioterapia utilizados após recidiva incluíram a doxorubicina lipossômica (genótipo AT [n=5]: 4 [80%], genótipo TT [n=1]: 1 [100%]) e o melfalam (genótipo AT [n=5]: 1 [20%]), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo ($p = 0,240$). Todas estas doentes apresentaram progressão de doença durante a quimioterapia, tendo realizado, em média, 3,2 ciclos de doxorubicina lipossômica (genótipo AT [n=4]: 2,25 ciclos, com variação entre 1 e 3 ciclos; genótipo TT [n=1]: 7 ciclos; $p = 0,021$) e 3 ciclos de melfalam (genótipo AT [n=1]) – tabela 10.

Tabela 10. Caracterização da doença platino-resistente, segundo os grupos em estudo

Características	Genótipo AT	Genótipo TT	P
N=6	N=5	N=1	
Linhas para resistência (média)	1,8	2	0,704
Protocolo de QT após resistência – n (%)			
Doxorrubicina lipossômica	4 (80%)	1 (100%)	0,240
Melfalam	1 (20%)	0 (0%)	
Ciclos de doxorubicina lipossômica (média)	2,25	7	0,021

QT – quimioterapia.

4.3.2. Estádios avançados (FIGO IIB a IV)

O tratamento de 1ª linha para as doentes em estágio avançado, segundo os grupos em estudo, dependeu do volume de doença ao diagnóstico, sua ressecabilidade, e condições clínicas da doente (ECOG), não se tendo documentado diferenças significativas na abordagem terapêutica entre os dois grupos em estudo (tabela 11).

Tabela 11.

Análise estatística dos tratamentos efectuados, e sua resposta, nos grupos em estudo

Variáveis N = 102	Genótipo AT N = 44	Genótipo TT N = 58	P
Cirurgia			
Citorredução máxima primária	33 (75%)	45 (77,6%)	0,760
Citorredução máxima de intervalo	3 (6,8%)	9 (15,5%)	0,177
Citorredução máxima <i>second look</i>	4 (9,1%)	7 (12,1%)	0,631
Quimioterapia*			
Cisplatina+Paclitaxel	19 (43,2%)	31 (53,4%)	0,365
Carboplatina+Paclitaxel	25 (56,8%)	27 (46,6%)	
Resposta (RECIST)			
Completa ou parcial ou estável	38 (86,4%)	48 (82,8%)	0,620
Progressão	5 (11,4%)	10 (17,2%)	0,406
Resposta (Rustin)			
Completa ou parcial ou estável	34 (77,3%)	39 (67,2%)	0,266
Progressão	1 (2,3%)	3 (5,2%)	0,455

* O protocolo de quimioterapia com carboplatina e paclitaxel começou a ser utilizado em 2003.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação à resposta aos tratamentos efectuados entre os dois grupos.

As doentes em estágio avançado tinham um ECOG \leq 2 e uma mediana de número de co-morbilidades de 1 (variação de 0 a 4), sem diferenças estatisticamente significativas nos grupos em estudo [$p=0,313$ e $p=0,328$, respectivamente]). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na distribuição de doentes com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 pelos grupos em estudo (mutação do gene BRCA1 – genótipo AT [n=44]: 2 doentes [4,5%], genótipo TT [n=58]: 2 doentes [3,4%], $p = 0,659$; mutações do gene BRCA2 – genótipo AT [n=44]: 0 doentes [0%], genótipo TT [n=58]: 1 doente [1,7%], $p = 0,350$).

Documentaram-se diferenças estatisticamente significativas na frequência de recidivas, após tratamento de 1ª linha, entre os grupos em estudo (diferenças estatisticamente significativas para as recidivas mistas, localizadas e à distância, e para as recidivas à distância – tabela 12).

Tabela 12. Caracterização da recidiva, após tratamento de 1ª linha, nos grupos em estudo

Características N=102	Genótipo AT N=44	Genótipo TT N=58	P	RR	IC95%	Correlação
Recidiva	35 (79,5%)	41 (70,7%)	0,128	2,132	0,940-6,949	0,131
Isolada CA125	1 (2,3%)	2 (3,4%)	0,728	0,651	0,215-4,610	0,731
Local	24 (54,5%)	26 (44,8%)	0,331	1,477	0,653-3,000	0,336
Local e à distância	10 (22,7%)	5 (8,6%)	0,046	3,118	0,888-12,272	0,047
Distância	0 (0%)	8 (13,8%)	0,010	0,532	0,433-0,632	0,010

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo para a mediana de tempo até 1ª recidiva ou progressão de doença (genótipo AT [n=44]: 10,0 meses [IC95%: 6,0-14,5], genótipo TT [n=58]: 11,0 meses [IC95%: 1,0-17,0]), $p = 0,904$).

O desenvolvimento de doença platino-resistente foi observado em 51 doentes (67,1%), sem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em estudo (genótipo AT [n=35]: 21 [60,0%], genótipo TT [n=41]: 30 [73,2%], $p = 0,223$).

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas no número mediano de linhas de quimioterapia efectuadas antes do desenvolvimento de doença platino-resistente (genótipo AT [n=21]: 1,0 linhas [IC95%: 1,0-2,0], genótipo TT [n=30]: 1,0 linhas [IC95%: 1,0-2,0]; $p = 0,836$). O tempo mediano para desenvolvimento de resistência foi de 1,00 mês para as doentes com genótipo AT (IC95%: 0,00-2,00) e de 1,00 mês para as doentes com genótipo TT (IC95%: 0,18-1,63), $p = 0,904$.

Das 51 doentes que desenvolveram resistência, 15 foram orientadas para o serviço de cuidados paliativos (SCP, i.e. não fizeram mais tratamentos dirigidos à doença) e 36 fizeram tratamento com outros protocolos de quimioterapia, não se observando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (orientação para o SCP – genótipo AT [n=21]: 4 [19%], genótipo TT [n=30]: 11 [36,7%], $p=0,174$).

Os protocolos de quimioterapia utilizados após recidiva incluíram a doxorrubicina lipossômica, a associação de doxorrubicina lipossômica com carboplatina, o topotecano, o melfalam, a gemcitabina e o paclitaxel, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo ($p = 0,702$) – *vide infra* tabela 13. Observou-se progressão de doença em 32 doentes (88,9%), sem diferenças significativas entre os grupos em estudo ($p = 0,542$). O tempo mediano para progressão de doença, após último ciclo de quimioterapia, foi de 0,5 meses nas doentes com genótipo AT (variação entre 0,0 e 19,0 meses) e de 1,0 mês nas doentes com genótipo TT (variação entre 0,0 e 7,0 meses), $p = 0,763$. Não foram documentadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo para o tempo mediano de progressão de doença segundo o esquema de quimioterapia utilizado (tabela 13).

Tabela 13.

Caracterização da QT após doença platino-resistente, segundo os grupos em estudo

Características	Genótipo AT	Genótipo TT	P
N=36	N=17	N=19	
Protocolo de QT após resistência – n (%)			0,702
Doxorrubicina lipossômica	9 (52,9%)	9 (47,4%)	
Doxorrubicina lipossômica + carboplatina	0 (0,0%)	1 (5,3%)	
Topotecano	5 (29,4%)	6 (31,6%)	
Melfalam	2 (11,8%)	2 (10,5%)	
Gemcitabina	1 (5,9%)	0 (0,0%)	
Paclitaxel	0 (0,0%)	1 (5,3%)	
Progressão de doença – n (%)	16 (94,1%)	16 (84,2%)	0,542
Tempo para a progressão em meses	0,5	1,0	0,763
mediana [IC95%]	[0,0-19,0]	[0,0-7,0]	

QT – quimioterapia.

Discussão

5. Discussão

O estudo da influência do polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* no prognóstico e resposta ao tratamento em doentes com CEO justifica-se porque existe suporte científico suficiente que sugere o envolvimento da *IL-8* como um elemento importante na progressão tumoral e na resposta tumoral a fármacos anti-angiogénicos (como o paclitaxel e o bevacizumab)^{58,62-65,68-70}, a frequência deste polimorfismo é elevada o suficiente para supor que o seu estudo tenha impacto clínico (frequência do alelo A variável entre 30% e 50%, conforme a população estudada)^{70,96}, e porque existe evidência científica suficiente para supor que a presença deste polimorfismo altera a função do gene de forma biologicamente relevante (alelo A associado a maior expressão da *IL-8*, assim como maior agressividade e resistência à terapêutica em vários tumores malignos)^{70,96-99,102,103,105}.

A frequência dos genótipos do SNP -251 T/A da *IL-8* neste estudo foi de 50,6% para o genótipo T/T, 49,9% para o genótipo A/T, e 0% para o genótipo A/A, estando, em relação aos doentes heterozigóticos, de acordo com as frequências reportadas na literatura.^{70,96} Contudo, seria de esperar encontrar doentes homozigóticas para o genótipo AA (a frequência do genótipo AA no estudo de Anne Shultheis *et al* foi de 24,6%⁷⁰). Esta diferença pode-se dever a vários factores: diferenças étnicas e clínicas das populações estudadas (as doentes do estudo de Anne Shultheis *et al* eram doentes de várias etnias, com CEO recorrente, tendo sido sujeitas a uma selecção estrita no âmbito de um ensaio clínico com quimioterapia metronómica com bevacizumab e ciclofosfamida⁷⁰), viés de selecção (a amostra populacional deste estudo é uma amostra de oportunidade; apesar da recolha das amostras de sangue se ter processado ao longo de vários anos, antes do desenho do presente estudo, esta amostra poderá estar sujeita a vários viéses de selecção, como por exemplo, selecção de doentes com melhor prognóstico e que viveram mais tempo e isso poder influenciar a frequência dos genótipos, se as doentes homozigóticas AA apresentassem um pior prognóstico, como é sugerido por alguns estudos^{64,68,70}), erros na metodologia laboratorial (não foi possível genotipar 25% das amostras de ADN de doentes seleccionadas para este estudo, porque não amplificaram; o protocolo para genotipagem do ADN utilizado neste estudo foi validado noutros estudos internacionais⁹⁵ e está bem estabelecido na Unidade de Oncologia Molecular do IPO Porto, pelo que se supõe que o problema principal na amplificação dessas amostras esteja relacionado com a qualidade do ADN das mesmas; as condições e tempo de

crioconservação dessas amostras não foram diferentes das outras amostras que amplificaram e foram genotipadas; assim, a qualidade desse ADN deveria estar comprometida desde a colheita e isso poderia ser justificado se essas colheitas fossem efectuadas durante os tratamentos de quimioterapia, altura em que a disponibilidade de células nucleadas sanguíneas para extracção do ADN estaria reduzida; se as doentes com genótipo AA apresentassem um pior prognóstico, seria provável que as colheitas de sangue dessas doentes pudessem ter sido realizadas durante os tratamentos de quimioterapia; contudo, seria pouco provável que isso acontecesse em todas as doentes com genótipo AA; por outro lado, não sabemos a influência que este genótipo pode ter ao nível das células do sistema imunológico circulantes e se esse genótipo pode, ou não, influenciar os seus níveis).

A análise da relação entre o polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* e os factores de prognóstico estudados mostrou que as doentes com genótipo AT apresentavam um risco relativo duas vezes superior de terem CEO num estágio precoce (FIGO IA a IIA) do que as doentes com genótipo TT (RR = 2,063, IC95%: 1,160-3,910, $p = 0,029$ – *vide supra* tabela 7), com a existência de correlação significativa entre estas variáveis ($p = 0,029$).

Por outro lado, a percentagem de doentes com genótipo TT em estádios III e IV foi semelhante ao descrito na literatura (67,1%), enquanto a percentagem de doentes com genótipo AT em estágio III e IV foi inferior ao descrito na literatura (48,9%).³ Este é um dado novo, ainda não reportado na literatura, já que não há estudos sobre a frequência destes genótipos nesta área (que sejam do nosso conhecimento). Contudo, os estudos com o doseamento dos níveis da *IL-8* no CEO relacionam níveis mais elevados da *IL-8* com os estádios mais avançados da doença.^{64,68,69} Segundo os cálculos do tamanho amostral, o número de doentes estudado é suficiente para um nível de significância de 5%. Com base nestes dados, torna-se difícil concluir com certeza que o genótipo AT esteja relacionado com um estágio precoce na altura do diagnóstico de doentes com CEO, não se podendo excluir que este resultado seja um erro de tipo 1. Estudos futuros prospectivos, com maior número de doentes, poderão ajudar a clarificar este resultado.

A nossa amostra parece estar bem equilibrada e de acordo com a literatura no que se refere à distribuição da frequência dos outros factores de prognóstico pelos dois genótipos.³

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação à sobrevivência livre de progressão nem em relação à sobrevivência global entre os dois grupos em estudo. Os resultados obtidos mostraram que a sobrevivência livre de progressão aos 5 anos (figura 9) foi de 49,8%, para as doentes com genótipo AT, e de 47,5%, para as doentes com genótipo TT ($p = 0,704$), enquanto a sobrevivência global aos 5 anos (figura 11) foi de 67%, tanto para as doentes com genótipo AT quanto para as doentes com genótipo TT ($p = 0,774$). Estes valores de sobrevivência são superiores aos reportados na literatura^{1,3}, mas estão de acordo com os dados da clínica de ginecologia do IPO Porto (dados não publicados), justificando-se, muito provavelmente, porque a clínica possui uma equipa multidisciplinar especializada no tratamento de CEO.

A análise estratificada, por subgrupos clínicos e patológicos, mostrou uma diferença de 73 meses na média da sobrevivência livre de progressão entre as doentes com genótipo AT e TT com carcinoma de células claras (menor sobrevivência livre de progressão nas doentes com genótipo TT), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,104$). Este resultado é bastante interessante. O carcinoma de células claras do ovário constitui um subtipo histológico de CEO ainda pouco compreendido, talvez por ser pouco frequente (corresponde a cerca de 3-10% de todos os subtipos histológicos de CEO¹⁸), e é caracterizado por apresentar, nos estádios avançados da doença, um pior prognóstico e relativa resistência à quimioterapia baseada em platinos, relativamente aos outros subtipos histológicos de CEO¹⁰⁹ (paradoxalmente, apresenta um bom prognóstico se diagnosticado em fases precoces da doença¹⁰⁹), e bastantes semelhanças com o carcinoma de células claras do rim.^{5,19,109} O carcinoma de células claras do rim é um tumor extremamente imunogénico, agressivo e habitualmente quimio-resistente, que está fortemente dependente de vias moleculares como aquelas relacionadas com angiogénese (através da inativação do gene de *Von Hippel-Lindau*, vide *supra* figura 5), tendo sido um dos tumores que mais beneficiou com os avanços terapêuticos da última década nesta área (e.g. com o desenvolvimento de inibidores da tirosina cínase, como o sunitinib e o sorafenib, e de outros agentes anti-angiogénicos, como o bevacizumab).¹¹⁰ Assim, faz sentido pensar, teoricamente, que o polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* tenha influência no prognóstico de doentes com carcinoma de células claras do ovário. Tendo em conta que o número global de doentes com carcinoma de células claras nesta população era baixo (apenas 18 doentes [11,1% das doentes com CEO], das quais 10 apresentavam genótipo AT e 8 apresentavam genótipo TT, vide *supra* tabela 7), o que está de acordo com os dados publicados na literatura¹⁸, é possível que a ausência de significado estatístico pudesse estar em relação com a falta de poder estatístico. Assim, decidimos fazer a análise conjunta destas doentes com as doentes

com subtipo histológico misto com componente histológico de mau prognóstico, pois sabíamos que em várias destas doentes o componente histológico de mau prognóstico era o carcinoma de células claras (infelizmente, devido à forma como se colheram os dados, não foi possível identificar essas doentes, e por isso, analisaram-se todas, apesar das limitações que isso acarreta na análise final dos resultados). As diferenças encontradas na sobrevivência livre de progressão entre os dois grupos foram, desta vez, estatisticamente significativas (sobrevivência livre de progressão aos 5 anos de 93,8% para as doentes com genótipo AT e de 57,8% para as doentes com genótipo TT, $p=0,015$), e mantiveram-se estatisticamente significativas após análise multivariada, com um HR = 2,128 e um $p = 0,048$ (*vide supra* figura 10). Contudo, não tiveram impacto na sobrevivência global, apesar desta ser menor nas doentes com genótipo TT (sobrevivência global aos 5 anos de 93,8% para as doentes com genótipo AT e de 85,6% para as doentes com genótipo TT, $p = 0,272$ – *vide supra* figura 12). Estes dados sugerem que a presença do genótipo AT pode ser um factor de bom prognóstico no subgrupo de doentes com carcinoma de células claras do ovário, apesar de serem necessários estudos prospectivos, com maior poder estatístico, de modo a se conseguir esclarecer melhor este resultado.

Em termos de análise global da resposta aos tratamentos de quimioterapia efectuados, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as doentes com genótipo AT e as doentes com genótipo TT. A análise do subgrupo de doentes com doença em estágio precoce mostrou existir maior risco de recidiva para as doentes com genótipo AT, sem diferenças no que corresponde ao tipo de recidiva entre os dois grupos (RR = 7,333, $p = 0,039$, correlação significativa com $p = 0,040$) – *vide supra* tabela 9 – mas nas doentes com doença em estágio avançado não se observaram diferenças significativas no risco global de recidiva entre os dois grupos. Este resultado é novo no estudo da influência do polimorfismo -251 T/A do gene da IL-8 na resposta aos tratamentos de doentes com CEO, e está de acordo com os resultados de outros estudos da literatura efectuados para a IL-8.^{64,68,69}

Por outro lado, na análise dos resultados por tipo de recidiva, observou-se que, no grupo de doentes com CEO em estágio avançado, o genótipo AT é um factor protector do risco de recidiva à distância (RR=0,532, IC95%: 0,433-0,632, $p=0,010$, correlação significativa com $p=0,010$) e, provavelmente, um factor de risco para a recidiva mista, local e à distância (RR=3,118, apesar de não significativo porque o IC95% é de 0,888-12,272, $p=0,046$) – *vide supra* tabela 12. Os resultados observados parecem ser independentes da influência de outros factores, apesar da regressão logística linear não

ter sido efectuada, visto apresentarem correlações significativas. Estes resultados sugerem que o polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* poderá ter influência nos mecanismos de progressão e metastização tumorais. Assim, nas doentes com CEO em estágio avançado, o genótipo TT poderá favorecer as formas de progressão tumoral à distância, sugerindo que os níveis e influência da *IL-8* no microambiente tumoral primário possam ser diferentes entre as doentes com genótipo AT e as doentes com genótipo TT, de acordo com o descrito na literatura.^{58,62,63,94} Seria interessante avaliar a influência deste polimorfismo nos níveis de *IL-8* de doentes com CEO e correlacioná-la com a vasculogénese e resposta imunológica associadas ao tumor, com o estágio e volume de doença ao diagnóstico, assim como com o risco de metastização à distância.

Finalmente, não se observaram diferenças no risco de desenvolvimento de doença platino-resistente entre as doentes com genótipo AT e as doentes com genótipo TT. No subgrupo de doentes em estágio precoce, que progrediram e desenvolveram doença platino-resistente, observaram-se diferenças significativas no número médio de ciclos efectuados de doxorubicina lipossómica entre as doentes com genótipo AT (em média 2,25 ciclos) e a doente com genótipo TT (que fez 7 ciclos, $p = 0,021$), podendo sugerir que neste subgrupo de doentes o genótipo TT seja factor preditivo de menor resistência à quimioterapia com doxorubicina lipossómica. Os dados reportados na literatura sugerem que a *IL-8* é um factor preditivo de resistência primária ao tratamento com agentes como o paclitaxel⁶⁵ e que o polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* é factor preditivo de resposta à quimioterapia metronómica com bevacizumab e ciclofosfamida⁷⁰, como seria de esperar tendo em conta os mecanismos de acção da *IL-8* e desses fármacos.^{58,65} Contudo, nenhuma associação foi encontrada entre a *IL-8* e a resposta ao tratamento com doxorubicina lipossómica.⁶⁵ Por outro lado, o número de doentes nestas condições era muito reduzido (*vide supra* tabela 10), pelo que os resultados obtidos poder-se-ão dever apenas ao acaso e não ser verdadeiros.

Conclusão

6. Conclusão

Os resultados observados neste estudo sugerem que o polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* poderá ser um factor de prognóstico nas doentes com CEO. O genótipo AT parece estar relacionado com os estádios de doença mais precoce, com maior risco de recidiva nas doentes com CEO em estágio precoce, mas menor risco de recidiva (ou progressão de doença) à distância em doentes com CEO em estágio avançado, e, provavelmente, com o aumento da sobrevivência livre de progressão em doentes com carcinoma de células claras do ovário. Alguns destes resultados não foram os esperados, tendo em conta os dados reportados na literatura em estudos efectuados com a *IL-8* e com o polimorfismo genético -251 T/A da *IL-8*.^{58,64,65,68-70,94} No entanto, este é o primeiro estudo que pretende avaliar, especificamente, a influência do polimorfismo -251 T/A do gene da *IL-8* como factor prognóstico e preditivo de resposta em doentes com CEO e, apesar das limitações existentes (a maioria inerente ao facto de ser um estudo retrospectivo), os seus resultados parecem ser válidos e consistentes, pelo que justificam o desenho de estudos prospectivos no futuro, para que sejam esclarecidos.

Os resultados do ensaio clínico de fase III, OCEANS, apresentados na reunião da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) em Junho de 2011, vieram renovar o interesse pelas terapêuticas alvo, nomeadamente com o bevacizumab, no tratamento de doentes com CEO recorrente platino-sensível.¹¹¹ Este estudo incluiu 484 igualmente distribuídas por dois ramos de estudo (ramo A: carboplatina + gemcitabina + placebo; ramo B: carboplatina + gemcitabina + bevacizumab) e demonstrou haver um aumento significativo da sobrevivência livre de progressão para as doentes incluídas no ramo B em relação às doentes do ramo A (diferença de medianas de sobrevivência de 4 meses, HR=0,484, $p<0,0001$).¹¹¹ Contudo, pouco se sabe ainda sobre o mecanismo de acção deste tipo de terapêuticas anti-angiogénicas. Várias questões permanecem por responder, como por exemplo quais os melhores marcadores de resposta a estas terapêuticas, que factores influenciam a sua eficácia, porque o benefício clínico destes tratamentos têm sido menor ao esperado, quais os melhores esquemas a utilizar ou que efeitos esperar após a suspensão destes tratamentos.

Tendo em conta os dados reportados na literatura, a IL-8 parece ser um marcador muito interessante a ser estudado nas doentes sob terapêutica anti-angiogénica, já que níveis aumentados parecem conferir resistência ao tratamento, nomeadamente, com o bevacizumab.^{65,70} Por outro lado, cerca de 90% das doentes com CEO apresentam níveis elevados de IL-8⁷⁰, o que nos faria prever uma menor resposta a estas terapêuticas, o que é contrariado pelos resultados dos ensaios clínicos recentemente publicados. Seria interessante desenhar um estudo prospectivo, em doentes com CEO tratadas com bevacizumab, onde se avaliasse a influência do polimorfismo -251 T/A da *IL-8* nos níveis da IL-8 e relacioná-lo com outros marcadores biológicos (e.g. VEGF, células endoteliais circulantes e células progenitoras circulantes), factores de prognóstico (e.g. subtipo histológico), e resposta à terapia, de modo esclarecer se a IL-8 poderá servir como marcador de resposta ao bevacizumab e se variações inter-individuais dos seus níveis, nomeadamente pela expressão do haplótipo -251 A, poderão conferir maior risco de falência terapêutica, seleccionando-se deste modo o grupo de doentes que mais beneficiariam com este agente.

Porto, 30 de Setembro de 2011

Dânia Sofia Neiva Marques Santos

Referências

- 1 Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians* **60**, 277 (2010).
- 2 Pontes, L. & Bento, M. Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO). *Instituto Português de Oncologia, Centro Regional Oncológico do Porto* (2006).
- 3 Colombo, N. *et al.* Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **21**, v23 (2010).
- 4 Schorge, J. *et al.* SGO White Paper on Ovarian Cancer: Etiology, Screening and Surveillance. *Gynecologic oncology* **119**, 7-17 (2010).
- 5 Gubbels, J., Claussen, N., Kapur, A., Connor, J. & Patankar, M. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* **3**, 8 (2010).
- 6 Choi, J., Wong, A., Huang, H. & Leung, P. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocrine reviews* **28**, 440 (2007).
- 7 Risch, H. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1774 (1998).
- 8 Antoniou, A. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics* **72**, 1117-1130 (2003).
- 9 Tan, D. *et al.* "BRCAness" Syndrome in Ovarian Cancer: A Case-Control Study Describing the Clinical Features and Outcome of Patients With Epithelial Ovarian Cancer Associated With BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 5530 (2008).
- 10 Fathalla, M. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* **2**, 163 (1971).
- 11 Chiaffarino, F. *et al.* Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. *Annals of Oncology* **12**, 337 (2001).
- 12 Cramer, D. & Welch, W. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **71**, 717 (1983).
- 13 Ness, R. B. & Cottreau, C. Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1459-1467 (1999).
- 14 Iwatsuki, M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer science* **101**, 293-299 (2010).
- 15 Brinton, L. *et al.* Ovarian cancer risk after the use of ovulation-stimulating drugs. *Obstetrics & Gynecology* **103**, 1194 (2004).
- 16 Whittmore, A., Harris, R. & Itnyre, J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies: II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. *American journal of epidemiology* **136**, 1184 (1992).
- 17 Zheng, W. *et al.* Ovarian epithelial tumor growth promotion by follicle-stimulating hormone and inhibition of the effect by luteinizing hormone. *Gynecologic oncology* **76**, 80-88 (2000).
- 18 Rosen, D. *et al.* Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **14**, 2089-2102 (2010).
- 19 Dubeau, L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecologic oncology* **72**, 437-442 (1999).
- 20 Naora, H. Developmental patterning in the wrong context: the paradox of epithelial ovarian cancers. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **4**, 1033 (2005).

- 21 Cheng, W., Liu, J., Yoshida, H., Rosen, D. & Naora, H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med* **11**, 531-537 (2005).
- 22 Landen, C., Birrer, M. & Sood, A. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 995 (2008).
- 23 Levanon, K., Crum, C. & Drapkin, R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 5284 (2008).
- 24 Kurman, R. J. & Shih, I.-M. Pathogenesis of Ovarian Cancer: Lessons From Morphology and Molecular Biology and Their Clinical Implications. *International Journal of Gynecologic Pathology* **27**, 151-160 (2008).
- 25 Shih, I. & Kurman, R. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *American Journal of Pathology* **164**, 1511 (2004).
- 26 Bafna, S., Kaur, S. & Batra, S. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* **29**, 2893-2904 (2010).
- 27 Duska, L. & Herzog, T. SGO White Paper on Ovarian Cancer: Etiology, Screening and Surveillance. *Gynecologic oncology* **119**, 7-17 (2010).
- 28 Moore, R. *et al.* The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic oncology* **108**, 402-408 (2008).
- 29 Moore, R. *et al.* A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecologic oncology* **112**, 40-46 (2009).
- 30 Odicino, F., Pecorelli, S., Zigliani, L. & Creasman, W. T. History of the FIGO cancer staging system. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* **101**, 205-210 (2008).
- 31 ICON1 & EORTC-ACTION. International Collaborative Ovarian Neoplasm Trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm Trial: Two Parallel Randomized Phase III Trials of Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early-Stage Ovarian Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 105-112 (2003).
- 32 Bakkum-Gamez, J. N. *et al.* Influence of Intraoperative Capsule Rupture on Outcomes in Stage I Epithelial Ovarian Cancer. *Obstetrics & Gynecology* **113**, 11-17 10.1097/AOG.1090b1013e3181917a3181910c (2009).
- 33 ICON1. International Collaborative Ovarian Neoplasm Trial 1: A Randomized Trial of Adjuvant Chemotherapy in Women With Early-Stage Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 125-132 (2003).
- 34 Trimbos, J. *et al.* Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **95**, 113 (2003).
- 35 Trimbos, B. *et al.* Surgical Staging and Treatment of Early Ovarian Cancer: Long-term Analysis From a Randomized Trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* (2010).
- 36 McGuire, W. *et al.* Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *New England Journal of Medicine* **334**, 1 (1996).
- 37 Ozols, R. F. *et al.* Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 3194-3200 (2003).
- 38 Bell, J. *et al.* Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* **102**, 432-439 (2006).
- 39 Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *LANCET* **360**, 505-515 (2002).

- 40 Vasey, P. A. *et al.* Phase III Randomized Trial of Docetaxel–Carboplatin Versus Paclitaxel–Carboplatin as First-line Chemotherapy for Ovarian Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1682-1691 (2004).
- 41 Bristow, R. E., Tomacruz, R. S., Armstrong, D. K., Trimble, E. L. & Montz, F. J. Survival Effect of Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma During the Platinum Era: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology* **20**, 1248-1259 (2002).
- 42 Eisenkop, S. M., Spirtos, N. M., Montag, T. W., Nalick, R. H. & Wang, H.-J. The impact of subspecialty training on the management of advanced ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **47**, 203-209 (1992).
- 43 Vergote, I. *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine* **363**, 943-953 (2010).
- 44 Noriyuki, K. *et al.* Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *LANCET* **374**, 1331-1338 (2009).
- 45 Armstrong, D. *et al.* Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *New England Journal of Medicine* **354**, 34-43 (2006).
- 46 Ponnusamy, M. & Batra, S. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. *Journal of Ovarian Research* **1**, 4 (2008).
- 47 Pfisterer, J. *et al.* Gemcitabine Plus Carboplatin Compared With Carboplatin in Patients With Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer: An Intergroup Trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *Journal of Clinical Oncology* **24**, 4699-4707 (2006).
- 48 Pujade-Lauraine, E. *et al.* Pegylated Liposomal Doxorubicin and Carboplatin Compared With Paclitaxel and Carboplatin for Patients With Platinum-Sensitive Ovarian Cancer in Late Relapse. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 3323-3329 (2010).
- 49 Monk, B. J. *et al.* Trabectedin Plus Pegylated Liposomal Doxorubicin in Recurrent Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 3107-3114 (2010).
- 50 Bristow, R. E., Puri, I. & Chi, D. S. Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecologic oncology* **112**, 265-274 (2009).
- 51 Fong, P. C. *et al.* Poly(ADP)-Ribose Polymerase Inhibition: Frequent Durable Responses in BRCA Carrier Ovarian Cancer Correlating With Platinum-Free Interval. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 2512-2519, doi:10.1200/jco.2009.26.9589 (2010).
- 52 Burger, R. A. *et al.* Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or fallopian tube cancer (FTC): A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **28**, LBA1- (2010).
- 53 Konner, J. A. *et al.* Farletuzumab, a Humanized Monoclonal Antibody against Folate Receptor α , in Epithelial Ovarian Cancer: a Phase I Study. *Clinical Cancer Research* **16**, 5288-5295 (2010).
- 54 Hodi, F. S. *et al.* Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3005-3010 (2008).
- 55 Reinartz, S. *et al.* Vaccination of Patients with Advanced Ovarian Carcinoma with the Anti-Idiotypic ACA125. *Clinical Cancer Research* **10**, 1580-1587 (2004).
- 56 Schroder, J.-M. & Christophers, E. Identification of C5ades arg and an Anionic Neutrophil-Activating Peptide (ANAP) in Psoriatic Scales. *J Investig Dermatol* **87**, 53-58 (1986).
- 57 Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H. & Baggiolini, M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **149**, 755-761 (1987).
- 58 Waugh, D. J. J. & Wilson, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* **14**, 6735-6741 (2008).
- 59 Matsushima, K. & Oppenheim, J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* **1**, 2-13 (1989).

- 60 Roebuck, K. Regulation of interleukin-8 gene expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **19** (5), 429–438 (1999).
- 61 Xie, K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews* **12**, 375-391 (2001).
- 62 Koch, A. *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798-1801 (1992).
- 63 Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J. & Singh, R. K. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *The Journal of Immunology* **170**, 3369-3376 (2003).
- 64 Lokshin, A. E. *et al.* Circulating IL-8 and anti-IL-8 autoantibody in patients with ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **102**, 244-251 (2006).
- 65 Merritt, W. M. *et al.* Effect of Interleukin-8 Gene Silencing With Liposome-Encapsulated Small Interfering RNA on Ovarian Cancer Cell Growth. *Journal of the National Cancer Institute* **100**, 359-372 (2008).
- 66 Xu, L. & Fidler, I. Interleukin 8: An Autocrine Growth Factor for Human Ovarian Cancer. *Oncology Research* **12**, 97-106 (2001).
- 67 Murdoch, C., Monk, P. N. & Finn, A. CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* **11**, 704-712 (1999).
- 68 Kassim, S. K. *et al.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clinical Biochemistry* **37**, 363-369 (2004).
- 69 Ivarsson, K. *et al.* The Chemotactic Cytokine Interleukin-8--A Cyst Fluid Marker for Malignant Epithelial Ovarian Cancer? *Gynecologic oncology* **71**, 420-423 (1998).
- 70 Schultheis, A. M. *et al.* Polymorphisms and Clinical Outcome in Recurrent Ovarian Cancer Treated with Cyclophosphamide and Bevacizumab. *Clinical Cancer Research* **14**, 7554-7563 (2008).
- 71 Mizukami, Y. *et al.* Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1[alpha]-deficient colon cancer cells. *Nat Med* **11**, 992-997 (2005).
- 72 Fasciani, A. *et al.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian cystic pathology. *Fertility and sterility* **75**, 1218-1221 (2001).
- 73 Herrera, C. A. *et al.* Expression of metastasis-related genes in human epithelial ovarian tumors. *International Journal of Oncology* **20** (1), 5-13 (2002).
- 74 Mayerhofer, K. *et al.* Interleukin-8 serum level shift in patients with ovarian carcinoma undergoing paclitaxel-containing chemotherapy. *Cancer* **91**, 388-393 (2001).
- 75 Uslu, R. *et al.* Predictive value of serum interleukin-8 levels in ovarian cancer patients treated with paclitaxel-containing regimens. *International Journal of Gynecological Cancer* **15**, 240-245 (2005).
- 76 Brahim-Horn, C., Berra, E. & Pouyssegur, J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends in Cell Biology* **11**, S32-S36 (2001).
- 77 Maxwell, P. H. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensors and angiogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **13**, 29-37 (2002).
- 78 Semenza, G. L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* **64**, 993-998 (2002).
- 79 Brizel, D. M., Dodge, R. K., Clough, R. W. & Dewhirst, M. W. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **53**, 113-117 (1999).
- 80 Brown, J. M. & Giaccia, A. J. The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Research* **58**, 1408-1416 (1998).
- 81 Harrison, L. B., Chadha, M., Hill, R. J., Hu, K. & Shasha, D. Impact of Tumor Hypoxia and Anemia on Radiation Therapy Outcomes. *Oncologist* **7**, 492-508 (2002).

- 82 Wouters, B. G. & Brown, J. M. Cells at Intermediate Oxygen Levels Can Be More Important Than the "Hypoxic Fraction" in Determining Tumor Response to Fractionated Radiotherapy. *Radiation Research* **147**, 541-550 (1997).
- 83 Wouters, B. G. *et al.* Hypoxia as a target for combined modality treatments. *European journal of cancer* **38**, 240-257 (2002).
- 84 Zhong, H. *et al.* Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 α in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Research* **59**, 5830-5835 (1999).
- 85 Brizel, D. M., Sibley, G. S., Prosnitz, L. R., Scher, R. L. & Dewhirst, M. W. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **38**, 285-289 (1997).
- 86 Mabweesh, N. J. *et al.* 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer cell* **3**, 363-375 (2003).
- 87 Jung, Y., Isaacs, J., Lee, S., Trepel, J. & Neckers, L. Microtubule disruption utilizes an NF κ B-dependent pathway to stabilize HIF-1 α protein. *J Biol Chem* **278**, 7445-7452 (2003).
- 88 Escuin, D., Kline, E. R. & Giannakakou, P. Both Microtubule-Stabilizing and Microtubule-Destabilizing Drugs Inhibit Hypoxia-Inducible Factor-1 α Accumulation and Activity by Disrupting Microtubule Function. *Cancer Research* **65**, 9021-9028 (2005).
- 89 Bocci, G., Nicolaou, K. C. & Kerbel, R. S. Protracted Low-Dose Effects on Human Endothelial Cell Proliferation and Survival in Vitro Reveal a Selective Antiangiogenic Window for Various Chemotherapeutic Drugs. *Cancer Research* **62**, 6938-6943 (2002).
- 90 Sweeney, C. J. *et al.* The Antiangiogenic Property of Docetaxel Is Synergistic with a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody against Vascular Endothelial Growth Factor or 2-Methoxyestradiol but Antagonized by Endothelial Growth Factors. *Cancer Research* **61**, 3369-3372 (2001).
- 91 Knudsen, L. E., Loft, S. H. & Autrup, H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **482**, 83-88 (2001).
- 92 Brookes, A. J. The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177-186 (1999).
- 93 Erichsen, H. C. & Chanock, S. J. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer* **90**, 747-751 (2004).
- 94 Hull, J., Thomson, A. & Kwiatkowski, D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* **55**, 1023-1027 (2000).
- 95 Heinzmann, A., Ahlert, I., Kurz, T., Berner, R. & Deichmann, K. A. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* **114**, 671-676 (2004).
- 96 Kang, J. M. *et al.* The Effects of Genetic Polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on Helicobacter pylori-induced Gastroduodenal Diseases in Korea. *Journal of Clinical Gastroenterology* **43** (2009).
- 97 Nasr, H. B. *et al.* Association of IL-8 (-251)T/A polymorphism with susceptibility to and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Human Immunology* **68**, 761-769 (2007).
- 98 Lee, W.-P. *et al.* The -251T Allele of the Interleukin-8 Promoter Is Associated with Increased Risk of Gastric Carcinoma Featuring Diffuse-Type Histopathology in Chinese Population. *Clinical Cancer Research* **11**, 6431-6441 (2005).
- 99 Taguchi, A. *et al.* Interleukin-8 Promoter Polymorphism Increases the Risk of Atrophic Gastritis and Gastric Cancer in Japan. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **14**, 2487-2493 (2005).
- 100 Kim, S., Hagemann, A. & DeMichele, A. Immuno-Modulatory Gene Polymorphisms and Outcome in Breast and Ovarian Cancer. *Immunological Investigations* **38**, 324-340 (2009).
- 101 Kruszyna, Ł. *et al.* CCL2 -2518 A/G single nucleotide polymorphism as a risk factor for breast cancer. *Molecular Biology Reports* **38**, 1263-1267 (2011).

- 102 Snoussi, K. *et al.* Genetic Variation in IL-8 Associated with Increased Risk and Poor Prognosis of Breast Carcinoma. *Human Immunology* **67**, 13-21.
- 103 McCarron, S. L. *et al.* Influence of Cytokine Gene Polymorphisms on the Development of Prostate Cancer. *Cancer Research* **62**, 3369-3372 (2002).
- 104 Gordon, M. A. *et al.* Genomic profiling associated with recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Pharmacogenomics* **7**, 67-88 (2005).
- 105 Lurje, G. *et al.* Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Annals of Oncology* **19**, 1734-1741 (2008).
- 106 Gao, L.-B. *et al.* IL-8 -251A/T polymorphism is associated with decreased cancer risk among population-based studies: Evidence from a meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **46**, 1333-1343 (2010).
- 107 Eisenhauer, E. A. *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **45**, 228-247 (2009).
- 108 Rustin, G. J. S. Use of CA-125 to Assess Response to New Agents in Ovarian Cancer Trials. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 187-193 (2003).
- 109 Tan, D. S. P. & Kaye, S. Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. *Journal of Clinical Pathology* **60**, 355-360 (2007).
- 110 Escudier, B., Kataja, V. & Group, O. b. o. t. E. G. W. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **21**, v137-v139 (2010).
- 111 Aghajanian, C. *et al.* OCEANS: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab (BEV) in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian (EOC), primary peritoneal (PPC), or fallopian tube cancer (FTC). *ASCO Meeting Abstracts* **29**, LBA5007 (2011).

