

MARIA DEOLINDA PAULINO PEREIRA DE SOUSA PEREIRA

CARCINOMA DO OVÁRIO: POLIMORFISMOS DAS GLUTATIONAS S-TRANSFERASES E IMPLICAÇÕES NAS OPÇÕES TERAPÊUTICAS - DA CLÍNICA À BIOLOGIA MOLECULAR

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador - Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria - Professor Associado Convidado com Agregação

Afiliação - Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral - Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto; Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

Coorientador - Professor Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes

Categoria - Professor Catedrático Jubilado

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.



De acordo com o Artigo 34º do Decreto-Lei nº115/2013 foram utilizados neste trabalho resultados já publicados que a seguir se discriminam:

**Pereira D**, Assis J, Gomes M, Nogueira A, Medeiros R (2016) Improvement of a predictive model in ovarian cancer patients submitted to platinum-based chemotherapy: implications of a GST activity profile. *Eur J Clin Pharmacol* 72 (5):545-553. doi:10.1007/s00228-016-2015-3

Assis J, **Pereira D**, Gomes M, Marques D, Marques I, Nogueira A, Catarino R, Medeiros R (2013) Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implications of a CYP3A4 activity profile. *Int J Clin Exp Med* 6 (7): 552-61

Assis J, **Pereira D**, Medeiros R (2013) Ovarian cancer and DNA Repair: DNA Ligase IV as a potential key. *World J Clin Oncol* 4(1):14-24. doi: 10.5306/wjco.v4.i1.14



## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador, Professor Rui Medeiros, Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral – Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto pela orientação, apoio e estímulo permanente e amizade durante todos estes anos.

Ao meu Co-orientador, Professor Carlos Lopes, pela disponibilidade em orientar esta tese, pelo apoio e sugestões partilhadas ao longo dos anos.

Ao Grupo de Oncologia Molecular, em especial à Mestre Joana Assis pela dedicação incansável, extraordinário empenho e inextinguível apoio sem o qual não era possível a conclusão desta Tese. Um agradecimento também especial aos Mestres Augusto Nogueira e Mónica Gomes pela colaboração na área laboratorial.

À Dra Carla Bartosch, patologista do Serviço de Anatomia Patológica do IPO-Porto pela colaboração permanente e pela cedência das imagens de histologia apresentadas nesta Tese.

Ao meu Serviço de Oncologia Médica e à Clínica de Ginecologia pela motivação permanente como motor no melhor cuidado ao doente, na partilha de conhecimentos e participação na investigação.

Às doentes com carcinoma do ovário que tive o privilégio de acompanhar e de tratar ao longo do meu percurso como Oncologista dedico todo este trabalho.



## Índice geral

Índice de Figuras .....	9
Índice de Tabelas .....	9
Lista de Abreviaturas .....	11
Resumo .....	13
Abstract .....	15
Organização da Tese .....	17
<b>CAPÍTULO I</b>	
1.1. Introdução Geral .....	21
1.2. O carcinoma do ovário como modelo de aplicabilidade da Farmacogenômica à Oncologia.....	23
1.2.1. Epidemiologia Molecular .....	23
1.2.2. Carcinogênese .....	24
1.2.3. Fatores de Risco.....	26
1.2.4. Clínica e Diagnóstico .....	29
1.2.5. Histopatologia .....	31
1.2.6. Estadiamento .....	33
1.2.7. Fatores de Prognóstico.....	35
1.2.8. Tratamento.....	36
1.2.8.1. Tratamento de primeira linha.....	36
1.2.8.2. Tratamento da recorrência.....	40
1.2.8.3. Abordagens terapêuticas emergentes.....	45
1.2.9. A Farmacogenômica aplicada ao tratamento do carcinoma do ovário .....	47
1.2.9.1. Metabolismo dos fármacos e polimorfismos genéticos – o modelo das Glutathione S-Transferases .....	50
1.3. Objetivos .....	55
1.4. Referências Bibliográficas.....	56

## **CAPÍTULO II**

2.1. Apresentação clínica das doentes com carcinoma epitelial do ovário .....	73
2.1.1. População.....	73
2.1.2. Avaliação da População .....	73
2.1.3. Ética.....	73
2.1.4. Análise Estatística.....	74
2.1.5. Resultados .....	74
2.1.6. Referências Bibliográficas .....	80

## **CAPÍTULO III**

3.1. Improvement of a predictive model in ovarian cancer patients submitted to platinum-based chemotherapy: implications of a GST activity profile .....	83
--	----

## **CAPÍTULO IV**

4.1. Influence of <i>CYP3A4</i> genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a <i>CYP3A4</i> activity profile.....	103
---	-----

## **CAPÍTULO V**

5.1. Ovarian cancer and DNA repair: DNA ligase IV as a potential key.....	123
---	-----

## **CAPÍTULO VI**

6.1. Conclusões finais e perspectivas futuras.....	151
--	-----



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Epitélios onde potencialmente ocorrem alterações que levam ao desenvolvimento de carcinoma seroso de alto grau do ovário: A) Epitélio das fimbrias da trompa de Falópio; B) Epitélio da superfície do ovário; C) Cistos de inclusão no córtex do ovário.....	25
<b>Figura 2.</b> Tipos histológicos de tumores epiteliais do ovário (OMS, 2014). A) carcinoma seroso de alto grau; B) carcinoma seroso de baixo grau; C) carcinoma de células claras; D) carcinoma mucinoso; E) carcinoma endometrióide; F) carcinoma seromucinoso.....	32
<b>Figura 3.</b> Fluxograma representativo das opções terapêuticas para o tratamento de primeira linha do carcinoma epitelial do ovário, com indicação do ensaio clínico que determinou a sua aprovação. ....	38
<b>Figura 4.</b> Fluxograma representativo das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento do carcinoma epitelial do ovário recorrente, definida de acordo com o intervalo livre de platinos .....	41
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de ação dos platinos (adaptado de Hildebrandt, 2009). ....	52
<b>Figura 6.</b> Curva de <i>Kaplan-Meier</i> para o tempo de sobrevivência global (morte específica por cancro) das doentes com carcinoma epitelial do ovário (tempo em meses).....	77
<b>Figura 7.</b> Curva de <i>Kaplan-Meier</i> para o tempo de sobrevivência livre de doença das doentes com carcinoma epitelial do ovário (tempo em meses).....	77
<b>Figura 8.</b> Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para o tempo de sobrevivência global (morte específica por cancro) das doentes com carcinoma epitelial do ovário, de acordo com o estadiamento FIGO (tempo em meses). ....	78
<b>Figura 9.</b> Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para o tempo de sobrevivência global (morte específica por cancro) das doentes com carcinoma epitelial do ovário, de acordo com a sensibilidade aos platinos (tempo em meses).....	79

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais hipóteses formuladas para a etiologia do carcinoma epitelial do ovário .....	27
<b>Tabela 2.</b> Características clinico-patológicas das doentes com carcinoma epitelial do ovário incluídas no estudo.....	76
<b>Tabela 3.</b> Risco de morte a 5 anos das doentes com carcinoma epitelial do ovário, de acordo com diferentes características clínicas .....	79



## Lista de Abreviaturas

% – Percentagem

µg – Micrograma

95% CI – Intervalo de Confiança a 95%

ABC – *Adenosine Triphosphate-Binding Cassete*

BER – *Base Excision Repair*

c – Índice de Concordância

CO – Carcinoma do Ovário

CYP – Citocromo P450

ECOG – *Eastern Cooperative Oncology Group*

EMA – *European Medicines Agency*

FIGO – *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*

FSH – *Follicle-Stimulating Hormone*

GCIG – *Gynecologic Cancer InterGroup*

GST – Glutathione S-Transferase

HIPEC – Quimioterapia Intraperitoneal Hipertérmica

HR – *Hazard Ratio*

HR – *Homologous Recombination*

HRD – *Homologous Recombination Deficiency*

kb – *Kilobase*

LH – *Luteinizing Hormone*

mL – mililitro

MRI – Ressonância Magnética

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARP – *Poly(ADP-ribose) Polymerase*

pb – Pares de Base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Roreno – Registo Oncológico Regional do Norte

ROS – Espécie Reativa de Oxigénio

SG – Sobrevida Global

SLP – Sobrevida livre de progressão

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

SOPQ – Síndrome do Ovário Poliquístico

TC – Tomografia Axial Computorizada

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

U - unidade

v - Volume

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

wt - *Wild-Type*

$\chi^2$  - Qui-Quadrado

RECIST - *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

TBE - *Tris-borate EDTA buffer*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

## Resumo

O carcinoma do ovário representa cerca de 4 % de todos os diagnósticos de cancro na mulher a nível mundial. Apesar da baixa taxa de incidência, esta neoplasia maligna está associada a uma elevada taxa de mortalidade devido, em parte, ao diagnóstico tardio da doença uma vez que, em cerca de 75 % das doentes, o diagnóstico ocorre apenas em fases avançadas da doença.

A terapêutica sistémica com agentes citotóxicos assume um papel preponderante no tratamento do carcinoma do ovário estando preconizada para a maioria das situações, incluindo estadios iniciais com critérios de mau prognóstico. A estratégia terapêutica padrão para o carcinoma epitelial do ovário avançado baseia-se na cirurgia citorrredutora e estadiamento, seguida de quimioterapia adjuvante com platinos e taxanos. Esta neoplasia é considerada como quimiosensível, inclusivamente com taxas de resposta completa de 40 a 60% para doença avançada. Apesar da aparente eficácia do tratamento, cerca de 75% das doentes irão desenvolver recidiva e tornar-se-ão candidatas para terapia de segunda-linha. A recidiva do carcinoma do ovário é definida de acordo com o intervalo livre de progressão e, consequentemente, com o tempo livre de platinos. Os tumores recorrentes podem ainda ser quimiosensíveis e as doentes podem ser re-submetidas a quimioterapia à base de platinos com taxas de resposta diretamente proporcionais ao intervalo livre de tratamento, até à eventual emergência de doença resistente. Como resultado, a elevada percentagem de diagnósticos em fase avançada, e a recorrência frequente da doença limitam a eficácia do tratamento e a sobrevivência das doentes (45% a 5 anos).

A elevada heterogeneidade no intervalo livre de progressão e a sua direta associação com a resposta aos platinos, concomitantemente com o facto de 20 % das doentes ser intrinsecamente resistente a estes compostos, colocaram a hipótese que variações inter-individuais na resposta à terapia possam ser um importante determinante no prognóstico destas doentes. A presença de variações genéticas em enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos, nomeadamente dos platinos, poderá influenciar a resposta à terapia. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de polimorfismos genéticos das Glutathionas S-transferases, utilizando como modelo farmacogenético comparativo a enzima Citocromo P450 3A4, como fator de prognóstico e preditivo na resposta à quimioterapia em doentes com carcinoma do ovário. Assim, no período entre os anos de 1996 e 2012, foram admitidas no Instituto Português de Oncologia do Porto 1039 doentes com carcinoma epitelial do ovário.

Colocada a hipótese de que a resposta heterogênea à quimioterapia à base de platinos possa ser uma consequência da presença de variações inter-individuais na via de detoxificação destes agentes, desenvolvemos um estudo de base hospitalar do tipo coorte retrospectivo. Para tal, da amostragem de doentes com tratamento na instituição, foi selecionada uma amostragem de oportunidade de doentes submetidas a quimioterapia à base de cisplatina (75 mg/m<sup>2</sup>) ou carboplatina (AUC 5-7.5) e paclitaxel (175 mg/ m<sup>2</sup>), de 3/3 semanas, durante 6 ciclos, após cirurgia citoreduzora (n = 129), entre o ano de 1996 e 2004. Os resultados deste estudo demonstraram que doentes portadoras do genótipo *GSTM1* nulo apresentam um aumento na sobrevivência a 5 anos e um maior tempo livre de progressão quando comparado com doentes *GSTM1 wild-type* (teste *log rank*,  $P = 0,001$  e  $P = 0,013$ , respetivamente). Realizando uma análise multivariada por regressão de Cox verificamos que a inclusão da informação genética relativamente ao polimorfismo no gene *GSTM1* aumenta a capacidade preditiva do risco de morte após a quimioterapia (*c-index* de 0,712 para 0,833). Inclusive, o genótipo *GSTM1 wild-type* (HR, 2.29;  $P = 0,039$ ;  $P = 0,0136$ , após análise por *bootstrap*) surge como um dos preditores mais importantes do risco de morte. Por outro lado, o polimorfismo no gene *GSTT1* revelou não estar significativamente associado com o *outcome* clínico das doentes. Assim, o genótipo *GSTM1* poderá ser um marcador molecular útil na predição da resposta das doentes com carcinoma epitelial do ovário à terapia de primeira linha. A combinação de marcadores genéticos e clínicos poderá ser crucial para atingir uma melhoria significativa na sobrevivência destas doentes.

Otimizar a estratégia terapêutica do carcinoma do ovário e aumentar a incorporação racional e custo-efetiva dos agentes biológicos emergentes são domínios de elevada prioridade da prática clínica, que beneficiam e urgem da identificação de biomarcadores prognósticos e preditivos. A identificação de fatores responsáveis pela introdução de variabilidade na resposta ao tratamento das doentes tem se revelado um desafio apesar de que prever a sensibilidade aos platinos antes do tratamento apresente o potencial para significativamente aumentar ou restaurar a quimiosensibilidade nos doentes resistentes e recorrentes e, assim, melhorar a sobrevivência por esta neoplasia. Compreender a falência do tratamento com platinos poderá ser um passo essencial na tentativa de individualizar a terapêutica, selecionando as doentes mais prováveis de responder ao tratamento, com possibilidade de ajustar a dose e estratégias de seguimento.

## Abstract

Ovarian cancer represents 4% of all cancer diagnosis among women worldwide. Despite its low incidence, this malignant neoplasia is associated with a high mortality rate attributable, in part, to the late diagnosis as 75% of all cases are diagnosed at advanced stages.

Systemic treatment with cytotoxic agents assumes an important role in ovarian cancer treatment, being used to most cases, including early stages with high recurrence criteria. Standard treatment for epithelial ovarian cancer is based on cytoreductive surgery, followed by first-line chemotherapy with platinum and taxane agents. This neoplasia is considered chemosensitive, yielding 40 to 60% complete responses rates for advanced disease stages. Even though the apparent efficacy of treatment, up to 75% of patients will relapse and become candidates for second-line chemotherapy. The recurrent disease is classified based on progression-free interval and, consequently, with platinum-free interval. Recurrent tumors may still be chemosensitive and patients can be re-submitted to platinum-based chemotherapy, with response rates directly proportional to the treatment-free interval, until the eventual emergence of drug-resistant disease. As a result, the high percentage of late-stage diagnosis and the occurrence of tumor recurrence limit the treatment efficacy and the ovarian cancer 5-year survival rate remains only around 45%.

The high heterogeneity in the progression-free interval and its direct association with platinum response, coupled with the fact that 20% of patients are intrinsically resistant to these compounds at diagnosis, hypothesized that inter-individual variation in drug response might be a major determinant for ovarian cancer. Namely, the presence of genetic variations in drug metabolism enzymes might have an impact in treatment response. Therefore, the main purpose of this thesis was to evaluate the influence of genetic polymorphisms in Glutathione S-transferases, using the Cytochrome P450 3A4 enzyme as comparative pharmacogenetic model, as prognostic and predictive factor in chemotherapy response of ovarian cancer patients. Thus, from 1996 to 2012, 1039 epithelial ovarian cancer patients were admitted and treated in the Portuguese Institute of Oncology, Porto.

Established the hypothesis that the heterogeneous response to the platinum-based chemotherapy might be a consequence of the presence of inter-individual variations in the platinum-detoxification pathway, a retrospective cohort, hospital-based study was conducted. From the group of patients with treatment in this institution, an opportunity subset of patients was selected, which were submitted to

first-line chemotherapy, consisting in Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) and Cisplatin (75 mg/m<sup>2</sup>) or Carboplatin (AUC 5-7.5) at 21-day intervals for six cycles, after cytoreductive surgery (n = 129), between 1996 and 2004. The results of this study showed that *GSTM1*-null genotype patients presented a significantly longer 5-year survival and an improved time to progression when compared to *GSTM1* wild-type genotype patients (log rank test,  $P = 0,001$  e  $P = 0,013$ , respectively). Multivariate Cox regression analysis indicates that the inclusion of genetic information regarding *GSTM1* polymorphism increased the predictive ability of risk of death after ovarian cancer platinum-based chemotherapy (*c*-index from 0,712 to 0,833). Namely, *GSTM1* wild-type genotype emerged as one of the most important predictors of risk of death (HR, 2.29;  $P = 0,039$ ;  $P = 0,0136$  after bootstrap). No similar effect on survival was observed regarding *GSTT1* polymorphism. Therefore, *GSTM1* polymorphism might be a useful molecular marker to predict the response of ovarian cancer patients to platinum-based first-line chemotherapy. The combination of clinical and genetic markers might be a useful strategy to improve the survival of ovarian cancer patients.

The optimization of OC standard treatment strategies and the improvement of rational and cost-effective incorporation of emerging biological agents are domains of high priority research that would benefit from the identification of both prognostic and predictive biomarkers. The identification of the factors underlying the treatment response variability has proved to be a challenge albeit the ability to predict platinum sensitivity prior to treatment has the potential to significantly improve or restore chemosensitivity in resistant and recurrent patients and hence the OC survival. Understanding platinum-treatment failure might be an essential step in an attempt to tailor chemotherapy, choosing the patients most likely to benefit from therapy, with the possibility to adjust treatment dosage and follow-up strategies.



## Organização da Tese

A presente Tese está organizada em sete capítulos. O **Capítulo I** contempla uma breve introdução geral ao tema e uma detalhada revisão da literatura sobre o carcinoma do ovário como modelo de estudo, destacando algumas das problemáticas encontradas na prática clínica e que poderão ser esclarecidas pela investigação básica e translacional. Este capítulo culmina com a apresentação dos objetivos propostos para a realização deste trabalho. No **Capítulos II** é caracterizado o padrão de apresentação clínico das doentes com carcinoma epitelial do ovário admitidas e tratadas no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto), entre os anos de 1996 a 2012. Nos **Capítulos III-V** são individualmente apresentados os resultados publicados no âmbito desta Tese e, no **Capítulo VI**, são discutidas as conclusões gerais e algumas considerações no âmbito da Oncologia Médica.



# **CAPÍTULO I**



## 1.1. Introdução Geral

O cancro constitui um grave problema de saúde, representando uma das principais causas de morte a nível mundial. Dados epidemiológicos apontam para que, no ano de 2012, tenham ocorrido cerca de 14,1 milhões novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes por esta doença [1,2]. Tendo em conta as estimativas populacionais, assume-se que o efeito combinado entre o envelhecimento e o crescimento populacional irá potenciar o impacto epidemiológico das doenças oncológicas, estimando-se que, no ano de 2030, existam 20,3 milhões novos casos e 13,2 milhões de mortes por cancro [3,4]. Os dados epidemiológicos sugerem, ainda, que no ano de 2008 perto de 29 milhões de pessoas tenham permanecido vivas com evidência de cancro, num período de 5 anos após o diagnóstico. Para o ano de 2030, prevê-se um aumento deste valor para cerca de 80 milhões de pessoas, embora respeitante a um período de 5 ou mais anos após o diagnóstico [5].

Na Europa, para o ano de 2012, estima-se que tenham ocorrido cerca de 3,45 milhões de novos casos e 1,75 milhões de mortes por cancro. Contudo, apesar da população europeia representar apenas 10% da população mundial, as estimativas referidas representam 25% da totalidade dos casos diagnosticados e 20% das mortes registadas por esta doença a nível mundial [6]. Portugal não foge à regra pelo que os tumores malignos ocupam o segundo lugar como causa mais frequente de morte, representando 24,3% dos óbitos registados no país em 2013 [7].

A distribuição da incidência e mortalidade de algumas neoplasias varia com a localização geográfica das populações e com alguns dos seus hábitos e comportamentos. Evidências recentes indicam que as taxas de incidência de cancro nos países desenvolvidos praticamente dupliquem relativamente aos países em vias de desenvolvimento, apesar das taxas de mortalidade serem apenas 8 a 15% superiores. Esta disparidade reflete, sobretudo, a desigualdade nas estratégias de rastreio, diagnóstico e tratamento dos doentes [4].

O cancro engloba um grupo complexo de doenças com várias causas, sendo comumente encarado como uma doença heterogénea, complexa e multifatorial. Embora seja reconhecido o envolvimento de vários fatores genéticos na patogénese do cancro, os complexos mecanismos moleculares subjacentes ao processo de carcinogénese não se encontram ainda totalmente elucidados. Ao longo das últimas décadas, a intensa investigação biomédica realizada permitiu propor e clarificar inúmeras alterações genéticas e moleculares associadas ao processo de desenvolvimento neoplásico. É atualmente aceite que a maioria dos tumores, se não

a sua totalidade, apresenta em comum determinadas propriedades moleculares, bioquímicas e celulares. Por conseguinte, Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram a aquisição de seis alterações essenciais de forma a atingir o fenótipo maligno: 1) auto-suficiência em fatores de crescimento; 2) insensibilidade para sinais inibidores do crescimento; 3) evasão à apoptose; 4) potencial replicativo ilimitado; 5) capacidade angiogénica e 6) capacidade de invasão tecidual e metastização [8]. Contudo, atualmente é sugerido que outros fatores serão também cruciais e transversais à maioria das neoplasias, tendo sido proposto a inclusão de dois novos *hallmarks* do cancro, nomeadamente a capacidade de evasão aos mecanismos de vigilância imunológica e de reprogramação do metabolismo energético. Para além disso, a instabilidade genómica e os processos inflamatórios pró-tumorais são considerados como a base para a manifestação dos *hallmarks* propostos. Desta forma, a carcinogénese não deverá ser encarada como um processo autónomo por parte da célula neoplásica mas sim dependente da interação com outras células e fatores do microambiente tumoral [9].

A integração de novas técnicas de biologia molecular nos estudos epidemiológicos permitiu a abertura de novas perspetivas e janelas de oportunidade para a caracterização dos vários fatores e/ou co-fatores envolvidos no desenvolvimento desta doença. Este conceito tem sido explorado de modo a ampliar os estudos, incluindo a caracterização de novos biomarcadores moleculares. O rápido avanço alcançado através do Projeto do Genoma Humano, aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias, imprimiu uma nova face à Medicina em que a genómica poderá ser um instrumento de grande utilidade na prática clínica [10,11]. Adicionalmente, estudos de associação genómica permitiram inferir que o risco para cancro, o processo de progressão tumoral e o prognóstico parecem ser fortemente influenciados pelo *background* genético do indivíduo. A presença de variações genéticas, nomeadamente de polimorfismos funcionais no genoma Humano, fornece uma ampla e extensa variabilidade genética com possível impacto nos mecanismos celulares homeostáticos e tumorais [12,13].

O crescente aumento de informação sobre o papel dos polimorfismos genéticos na doença oncológica, bem como em outras áreas da Medicina, levou ao desenvolvimento de novos biomarcadores putativos e ao aparecimento de novas áreas de investigação. A Farmacogenética e a Farmacogenómica, pelo estudo de como as diferenças individuais influenciam a variabilidade nas respostas dos indivíduos aos fármacos, poderão possibilitar a definição de um perfil genético individualizado que possa prever a resposta a cada um dos procedimentos terapêuticos [14-17]. O

tratamento baseado em fármacos não exerce muitas vezes o efeito esperado, não resultando em benefício para o doente e, até em alguns casos, provocando toxicidades e outros efeitos secundários não desejados [15,16]. Desta forma, o principal objetivo da medicina personalizada é estabelecer uma relação entre o genótipo (isto é, polimorfismos ou mutações genéticas), o perfil de expressão genética e o fenótipo, interpretado como a variabilidade inter-individual em termos de resposta e toxicidade aos diversos agentes terapêuticos [17].

O sucesso dos agentes anti-neoplásicos usados no tratamento de diversas neoplasias encontra-se francamente limitado por diversos fatores, inclusive por fenómenos de resistência tumoral aos fármacos, pela diferente capacidade de metabolização/biotransformação de cada indivíduo e por fatores que condicionam o alvo terapêutico. Todos estes fatores podem depender da variabilidade individual que é observada nos genes que codificam as proteínas, enzimas ou recetores celulares envolvidos [11,15,16]. Além da ausência de eficácia de alguns fármacos, as reações adversas aos medicamentos são um importante e atual problema de saúde, sendo responsáveis por 3 a 8% das admissões hospitalares. Estima-se que a probabilidade de vir a desenvolver uma reação adversa no decurso de uma terapêutica sistémica seja de 6 a 15%. No tratamento oncológico com quimioterapia, estes valores são muito superiores, com grau de eficácia muito mais baixo e níveis de toxicidade muito mais elevados [18-22]. Por conseguinte, além das evidentes implicações na otimização terapêutica, a capacidade de prever a resposta individual ao tratamento apresenta importante repercussão socioeconómica.

Desta forma, o estudo de variantes alélicas específicas tem vindo a ser associadas com diferenças na resposta aos procedimentos clínicos, evidenciando o seu potencial papel na definição de novos fatores preditivos e de prognóstico em Oncologia.

## **1.2. O carcinoma do ovário como modelo de aplicabilidade da Farmacogenómica à Oncologia**

### **1.2.1. Epidemiologia Molecular**

O carcinoma do ovário (CO) representa cerca de 4% de todos os diagnósticos de cancro na mulher e cerca de 30% das neoplasias do foro ginecológico. A nível mundial, estima-se que surjam cerca de 239 000 novos casos de CO por ano,

representando a sétima neoplasia maligna mais frequente na mulher [2,23]. Assiste-se a uma grande variabilidade geográfica na incidência de CO, sendo francamente superior para países desenvolvidos, em que ultrapassa os 7,5/100 000 mulheres. Os valores mais baixos são registados para regiões africanas, com taxas de incidência inferiores a 5/100 000 mulheres. Relativamente às taxas de mortalidade, o CO representa a oitava causa de morte por cancro na mulher a nível mundial, com registo de aproximadamente 152 000 óbitos em 2012 [2].

No que concerne ao continente europeu, em 2012, registaram-se 65 684 novos casos de CO, com a morte estimada de 42 749 mulheres devido a esta doença, o que corresponde a mais de 25% dos óbitos registados para este tumor mundialmente [6]. De entre os tumores malignos do foro ginecológico, o CO é o primeiro causador de morte embora seja apenas a terceira neoplasia mais frequente, precedido do cancro do colo do útero e do endométrio [6,23]. Em Portugal, estimam-se aproximadamente 616 novos casos de CO por ano, com uma taxa de incidência ajustada à idade de 6,2/100 000 e uma taxa de mortalidade ajustada à idade de 3,1/100 000 mulheres [6]. Em 2010, na área abrangida pelo Registo Oncológico Regional do Norte de Portugal (RORENO), a taxa de incidência de CO foi de 7,9/100 000 mulheres (6,2 e 4,6/100 000 se taxa padronizada para a população europeia e mundial, respetivamente) [24].

Apesar de vários estudos epidemiológicos terem sido efetuados com o intuito de estabelecer uma relação entre diferentes fatores e o desenvolvimento do CO, ainda não foi possível identificar todos os fatores de risco associados a esta neoplasia [25,26]. Sabe-se, no entanto, que a idade, a existência de história familiar de cancro e a nuliparidade estão fortemente associadas ao desenvolvimento desta doença [27-29].

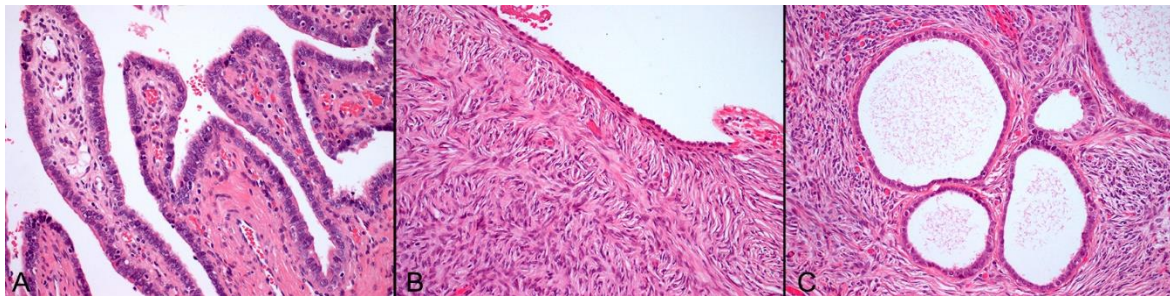
### **1.2.2. Carcinogénese**

Evidências recentes indicam que a maioria dos tumores do ovário pode ter origem no epitélio da superfície que reveste o ovário (mesotélio modificado), em inclusões de epitélio de revestimento no córtex ovárico (quistos de inclusão epitelial) ou a partir do epitélio das fímbrias da trompa de Falópio (Figura 1) [23].

Durante a ovulação mensal, a superfície epitelial do ovário é enzimaticamente degradada, de forma a permitir a rotura do folículo e a libertação do oócito, levando à formação de uma fissura que deverá ser posteriormente reparada [30-33]. Ao longo



da vida reprodutiva da mulher, este processo de dano e reparação é repetido inúmeras vezes e pode resultar na acumulação gradual de alterações genéticas, epigenéticas e moleculares. Para além do trauma físico a que estão sujeitas, as células da superfície epitelial do ovário estão expostas a inúmeros mediadores potencialmente oncogénicos libertados no decorrer da ovulação, como citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigénio (ROS) e hormonas/metabolitos hormonais reativos, capazes de introduzir danos no DNA e levar à desregulação do metabolismo hormonal [31,33-35].



**Figura 1.** Epitélios onde potencialmente ocorrem alterações que levam ao desenvolvimento de carcinoma seroso de alto grau do ovário: A) Epitélio das fimbrias da trompa de Falópio; B) Epitélio da superfície do ovário; C) Cistos de inclusão no córtex do ovário.

Os quistos de inclusão epiteliais podem ser formados durante o processo de ovulação ou ao longo do envelhecimento, ficando alojados no estroma ovárico. Uma vez no interior do ovário, as células epiteliais presentes nos quistos de inclusão estão expostas a um microambiente aberrante de estimulação autócrina/parácrina, rico em fatores de crescimento, como VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), citocinas e outras moléculas que promovem a aquisição de alterações metaplásicas e displásicas potenciadoras para a transformação maligna [30,33,35-37]. Apesar do papel preponderante do epitélio para a carcinogénese do ovário, estudos recentes realizados com peças de salpingooforectomia bilateral profilática em mulheres com risco genético parecem sugerir o epitélio tubárico como origem do carcinoma seroso do ovário de alto grau [29,38-41].

Apesar de não existirem modelos detalhados e validados para a carcinogénese do ovário, Shih e Kurman (2004) propuseram uma subclassificação dos tumores do ovário de acordo com o seu padrão de comportamento clínico, progressão tumoral, aspetos morfológicos e genéticos. Estes autores sugerem a existência de duas principais vias de carcinogénese, denominadas de Tipo I (baixo grau) e Tipo II (alto

grau), sendo um modelo de carcinogénese aceite exclusivamente para fins de investigação [42].

O protótipo dos carcinomas de Tipo I é o carcinoma seroso de baixo grau, caracterizado por morfologia com escassa atipia, uma clínica indolente e, na maioria dos casos, diagnóstico em estadios iniciais. Deste grupo fazem ainda parte os carcinomas mucinoso, endometrióide e de células claras. Para os tumores de Tipo I são reconhecidas lesões potencialmente precursoras de neoplasia, como displasia ou endometriose, estando identificadas sequências de eventos moleculares (como mutações *BRAF/KRAS/PTEN/ARID1A*) associadas a lesões morfológicas (adenoma, tumor *borderline*). Deste modo, é proposta um processo de progressão tumoral desde quisto de inclusão epitelial, cistoadenoma, tumor *borderline* até carcinoma.

O grupo dos tumores de Tipo II integra os carcinomas mais frequentes do ovário (75%) uma vez que o protótipo do grupo é o carcinoma seroso de alto grau, o carcinosarcoma e o carcinoma indiferenciado. Para este grupo não são conhecidas lesões precursoras e, morfológicamente, as neoplasias são de alto grau e clinicamente bastante agressivas. Os principais eventos moleculares descritos nesta via parecem surgir *ad initium* e englobam a instabilidade genética e mutações no gene *TP53*, em quase todos os casos [42].

### 1.2.3. Fatores de Risco

O conhecimento histogenético é fundamental na área da Oncologia para que possam ser definidas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento das neoplasias malignas. No que diz respeito ao CO, a etiologia e os eventos iniciais da carcinogénese ovárica ainda não se encontram perfeitamente conhecidos tendo sido sugeridas várias hipóteses que, baseadas em dados epidemiológicos e fisiológicos, pretendem explicar, mesmo que em parte, a origem deste tumor. Embora as hipóteses colocadas tenham como ponto de partida diferentes etiologias, as mesmas podem ser inter-relacionáveis e não são mutuamente exclusivas, podendo variar de acordo com a idade da doente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais hipóteses formuladas para a etiologia do carcinoma epitelial do ovário

Hipótese	Mecanismo biológico proposto	Evidências Epidemiológicas
<b>Ovulação Incessante</b> [43]	Ovulação repetitiva e a rápida proliferação celular para reparação pós-ovulação fornece um ambiente favorável para a iniciação da carcinogénese pelo acumular de alterações genéticas e desenvolvimento de quistos de inclusão. A inibição da ovulação reduz os níveis de gonadotropinas e de stress oxidativo, abrandamento da depleção dos folículos ováricos e diminuição da formação de quistos de inclusão no epitélio do ovário	Eventos que suprimam a ovulação, como a gravidez, lactação e uso de contraceptivos orais, são fatores protetores
<b>Gonadotropinas</b> [44]	A excessiva estimulação do epitélio do ovário pelas gonadotropinas pituitárias FSH e LH conduz à ativação de genes <i>downstream</i> e à estimulação da produção hormonal pelo ovário (como estrogénio) de forma a aumentar a proliferação e divisão celular e, assim, conduzir à transformação maligna/angiogénese tumoral. A formação de um <i>protective progestagenic hormonal milieu</i> poderá estimular a apoptose das células epiteliais geneticamente alteradas que de outra forma poderiam evoluir para um fenótipo maligno	O uso de contraceptivos orais e a gravidez são fatores protetores. Condições hipergonadotrópicas são comuns em mulheres inférteis, com SOPQ e pós-menopáusicas
<b>Estimulação Hormonal</b> [45]	Concentrações elevadas de androgénios são prejudiciais enquanto que um aumento na concentração de progesterona é benéfico	Efeito protetor da multiparidade e dos contraceptivos orais. Situações associadas com níveis elevados de androgénios, como SOPQ, conduzem a um aumento no risco de CO
<b>Inflamação</b> [46]	Processo de ovulação é acompanhado por uma resposta inflamatória: alteração do potencial <i>redox</i> , infiltração celular e libertação de citocinas que podem induzir dano no DNA das células epiteliais envolvidas no processo de rutura/reparação do ovário	Doenças inflamatórias ginecológicas, como a endometriose, podem aumentar o risco de CO. A toma de anti-inflamatórios não esteroides será um fator protetor

Abreviaturas: FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*); LH (*Luteinizing Hormone*); SOPQ (Síndrome do Ovário Poliquístico)

Nas mulheres pré-menopáusicas, o risco de desenvolvimento de CO é baixo, havendo um aumento acentuado deste risco após a menopausa, sendo os 63 anos a idade mediana do diagnóstico [47]. Para além da idade, um dos principais fatores de risco para o CO é a história familiar. Embora as mutações germinativas nos genes que predispõem para esta neoplasia sejam relativamente raras na população em geral estas são responsáveis por aproximadamente 10 - 20% de todos os casos de CO [35,48].

Os principais genes associados ao CO hereditário são o *BRCA1* e o *BRCA2*, sendo que a presença de mutações patogénicas nestes genes está associada à síndrome de cancro da mama/ovário hereditário. O risco de desenvolvimento de CO de forma esporádica, ao longo da vida, é cerca de 1,7% enquanto a herança de mutações germinativas que alterem a função do gene *BRCA1* confere um risco cumulativo de 40 - 60%, sobretudo para carcinoma seroso. A presença de mutações patogénicas no gene *BRCA2* diminui o risco para cerca de metade (10 - 30%). Mulheres

com CO hereditário tendem a desenvolver a doença cerca de 10 anos mais precocemente que doentes com CO não-hereditário [28,49,50]. A importância na identificação de mutações nos genes *BRCA* tem vindo a aumentar, não só pelo impacto de medidas profiláticas e de seguimento, mas também devido ao aparecimento de tratamentos emergentes dirigidos especificamente para tumores associados a estas mutações [28].

Causas mais raras de predisposição hereditária para tumores do ovário são as mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* na Síndrome de Lynch, que contribuem com um risco de 10% (85% dos casos do tipo de células claras e 10% do tipo endometrióide); no gene *STK11/LKB1* na Síndrome de Peutz-Jeghers, associado com um risco de 18-21% (sobretudo para tumores dos cordões sexuais e das células de Sertoli); no gene *PTCH1* na Síndrome de Gorlin (2 - 25% de risco para fibromas do ovário); e no gene *SMARCA4* para carcinoma de pequenas células do ovário do tipo hipercalcémico [49,51,50,52].

Recentemente, novos genes de suscetibilidade para CO têm sido identificados, como por exemplo o *RAD51C*, *RAD51D* e *BRIP1* ou genes da via de anemia de Fanconi (*FA/BRCA*). Com exceção das mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, as restantes mutações descritas são individualmente raras, embora quando agrupadas possam ser responsáveis por uma proporção significativa de casos. Adicionalmente, estudos de associação genómica têm permitido identificar vários *loci* associados com o risco de CO, sendo sugerido que o risco conferido por polimorfismos e outros modificadores genéticos, quando usados numa estratégia combinada, poderão ter um impacto significativo com futura aplicabilidade clínica [53].

Tal como postulado pelas hipóteses indicadas na Tabela 1, os fatores reprodutivos e endócrinos parecem ser também determinantes pelo que a nuliparidade, menarca precoce (<12 anos), menopausa tardia (>52 anos), endometriose, síndrome do ovário poliquístico e a exposição recente a terapêutica hormonal de substituição parecem estar associados a um aumento de risco para CO [26,29,54,55]. Fatores de risco adicionais poderão ser de origem ambiental, designadamente os hábitos tabágicos, sobretudo para o subtipo histológico mucinoso, a aplicação perineal de pó de talco e a exposição a asbestos. A obesidade parece ser também importante, já que mulheres com um índice de massa corporal superior a 30 mg/m<sup>2</sup> têm um risco aumentado de desenvolver esta doença [56,57].

Desta forma, algumas atitudes e estilos de vida foram associados a uma diminuição da incidência de CO, nomeadamente a amamentação, a multiparidade e a toma de contraceptivos orais [26,54]. Relativamente aos contraceptivos orais, inúmeros

estudos demonstraram de forma consistente que o seu uso prolongado reduz o risco desta neoplasia, verificando-se uma correlação entre a dose total de exposição e a diminuição da ocorrência de CO. O efeito protetor parece persistir por um período de 30 anos após a suspensão da sua utilização, embora o efeito seja atenuado ao longo do tempo [26,58,59]. Estes fármacos estão, contudo, associados a um aumento de risco de fenómenos tromboembólicos e a um aumento do risco de cancro da mama, especialmente em mulheres portadoras de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* [60].

Procedimentos cirúrgicos como a laqueação das trompas, a histerectomia com salpingectomia e a ooforectomia relacionam-se, igualmente, com a diminuição da incidência deste tumor. Contudo, estes procedimentos, nomeadamente a ooforectomia com salpingectomia, estão sobretudo reservados para mulheres com alto risco de desenvolver CO, após completarem o seu planeamento familiar.

Relativamente à influência dos tratamentos de infertilidade na incidência de CO, os dados publicados até à data são inconclusivos em relação à segurança desta prática, sendo que não existem evidências de qualquer efeito adverso clínico significativo [61].

#### **1.2.4. Clínica e Diagnóstico**

Os sintomas de CO nos estadios precoces são ausentes ou inespecíficos, pelo que cerca de 75% das doentes ao diagnóstico apresentam-se em estadios avançados da doença. Tal acontece devido à escassez da sintomatologia e à inexistência de um método de rastreio eficaz mas, sobretudo, devido à biologia deste tipo de tumores com grande capacidade de metastização intra-abdominal [48,62-64].

O diagnóstico em estadios iniciais ocorre habitualmente aquando da realização de um exame ginecológico de rotina ou na investigação clínica e/ou imagiológica de uma dor pélvica. Os sintomas surgem de forma inespecífica, seja sob a forma de sintomas do foro gastro-intestinal, tais como náuseas, enfiamento, diarreia/obstipação, ou do foro urológico, como polaquiúria. São também frequentes sintomas como sensação de peso e/ou dor pélvica, sendo que metrorragias e alterações do ciclo menstrual podem também ocorrer. Por outro lado, em estadios mais avançados, quando a massa tumoral atinge grande volume ou está presente carcinomatose peritoneal, é mais comum o aumento do volume abdominal com aparecimento de ascite e/ou dor abdominal por compressão do tumor nos órgãos intra-abdominais, anorexia e/ou emagrecimento progressivo. O quadro clínico pode

igualmente apresentar-se sob a forma de dispneia e polipneia quando está presente derrame pleural e/ou metastização pulmonar [28,63].

Perante a deteção de uma massa anexial suspeita de malignidade, a abordagem diagnóstica deve ser efetuada tendo como base a história clínica cuidadosa que englobe o exame físico geral da doente, exame ginecológico, toque retal e avaliação abdominal. Após a avaliação clínica, devem ser solicitados, de forma criteriosa e objetiva, exames complementares de diagnóstico e bioquímicos para auxiliar no diagnóstico diferencial com outras causas de massas pélvicas que não malignas. Dos exames complementares de diagnóstico, a ultrassonografia transvaginal ocupa o primeiro lugar na sequência de exames imprescindíveis no estudo imagiológico de uma massa pélvica bem como a determinação do marcador tumoral CA 125 [28,29,65].

O marcador tumoral CA 125 (valor normal <35 U/ml) é uma glicoproteína mucinosa oncofetal que, embora não seja específica do carcinoma epitelial do ovário, é o marcador mais frequentemente determinado no processo de diagnóstico desta neoplasia [29]. A sua sensibilidade como biomarcador é bastante variável (entre 24 e 97%), pois a sua expressão está dependente do estadio da doença e do tipo histológico, sendo tão mais sensível quanto a extensão da doença uma vez que só 50% dos diagnósticos apresentam elevação do CA 125 em estadio I. Na mulher pré-menopáusia, o CA 125 apresenta um papel mais limitativo visto que situações como endometriose, leiomiomatose, gravidez, doença inflamatória pélvica e adenomiose podem determinar a sua elevação. Em mulheres pós-menopáusias, um valor de CA 125 superior a 35 U/ml, que curse com uma massa pélvica, apresenta um valor preditivo de 85%, sendo que a sua determinação juntamente com a ecografia transvaginal aumenta consideravelmente a acuidade do diagnóstico. Contudo, outras neoplasias não ginecológicas (pulmão, mama ou gastrointestinal) podem também cursar com a sua elevação [28,29].

Na suspeita de neoplasia ovárica, deverá ser solicitado a tomografia axial computadorizada (TC) abdomino-pélvico, para confirmação da presença de lesão e a sua caracterização, avaliação da extensão tumoral, identificação de doença irrissecável e exclusão de doença metastática que não de origem ovárica. Todavia, o diagnóstico do CO é cirúrgico dado que perante uma massa anexial, radiologicamente suspeita de malignidade, só o exame anatomopatológico confirma o diagnóstico definitivo. A radiologia de intervenção ou laparoscopia diagnóstica devem ser solicitadas sempre que se preconize quimioterapia neoadjuvante [28,66]. A biópsia percutânea está

contra-indicada na avaliação de massas anexiais pelo elevado risco de disseminação intra-abdominal [67].

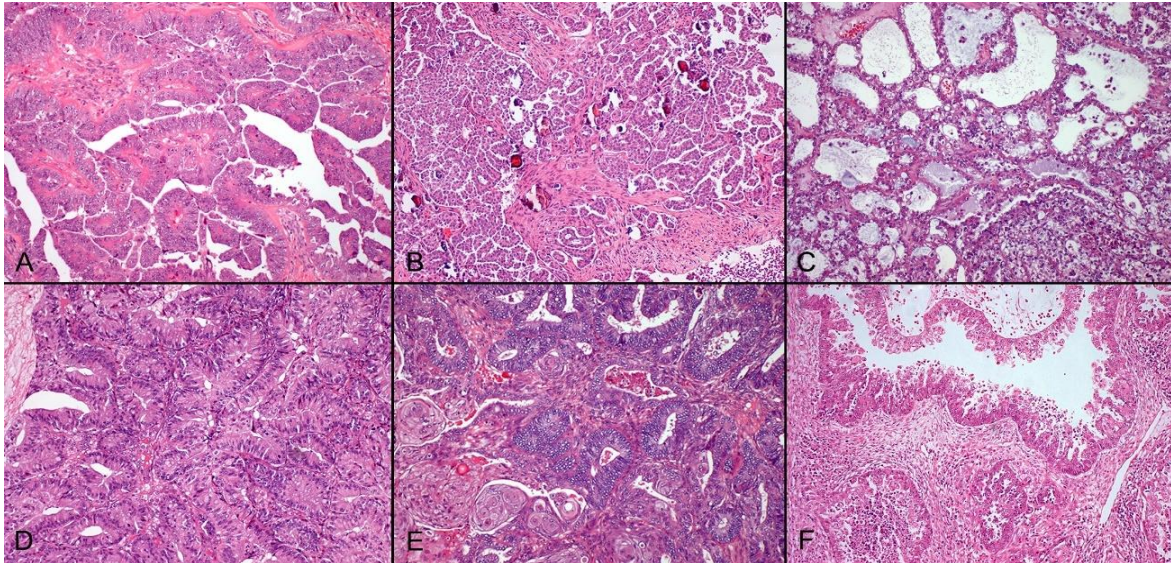
O diagnóstico em fases avançadas da doença explica, em parte, a elevada taxa de mortalidade destas doentes [29,68]. Nos últimos 25 anos, a melhoria da taxa de sobrevivência foi francamente insatisfatória sendo da ordem dos 37% no início da década de 70 e de 44% em 2000, apesar dos avanços no tratamento médico [69]. Segundo dados nacionais, a sobrevivência aos 5 anos é de cerca de 50% quando considerada doença local/loco regional, diminuindo para cerca de 15% perante doença metastática. Comparando com outros países europeus, Portugal apresenta uma das melhores taxas de sobrevivência, semelhantes às registadas para países do norte da Europa, sendo superior à média europeia [70].

Enquanto a mortalidade por CO se mantiver elevada, a sua deteção precoce constitui um enorme desafio. Porém, os testes atualmente disponíveis carecem de sensibilidade e especificidade adequadas, ou seja, não existe um método de rastreio eficaz. Estudos prospetivos demonstraram que o uso combinado da medição sérica do CA 125 e da ecografia transvaginal melhora a especificidade dos testes e permite detetar um número significativo de CO em fase pré-clínica. Existem já evidências que apontam para que o rastreio desta neoplasia possa melhorar a sobrevivência das doentes, mas o impacto do rastreio na mortalidade por CO está ainda por demonstrar. A necessidade de rastreio do CO é particularmente importante para mulheres portadoras de mutações associadas com as síndromes hereditárias deste tipo de tumor [29,71].

### **1.2.5. Histopatologia**

Os tumores do ovário correspondem a 30% das neoplasias malignas do trato ginecológico e a sua classificação deve ser efetuada segundo a proposta da Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores ginecológicos [23]. O CO apresenta uma elevada heterogeneidade celular sendo que a maioria dos tumores ováricos primários podem ser integrados em três grandes grupos de neoplasias, nomeadamente os tumores epiteliais, os tumores dos cordões sexuais e do estroma ovárico e os tumores com origem em células germinativas. Menos frequentemente podem ser identificados tumores miscelânea (outros tumores), mesoteliais, dos tecidos moles, linfomas e tumores secundários, isto é, metástases de neoplasias com origem extra-ovárica (7-10%) [23].

Embora a superfície epitelial do ovário represente apenas uma pequena fração de todos os tipos celulares presentes neste órgão, os tumores epiteliais do ovário são os mais comuns já que correspondem a cerca de 60% das neoplasias do ovário [36,56]. De acordo com os critérios propostos pela OMS de 2014, os tumores epiteliais do ovário dividem-se em sete categorias histológicas, nomeadamente tipo seroso, mucinoso, endometrióide, de células claras, Brenner, seromucinoso e indiferenciado (Figura 2) [23].



**Figura 2.** Tipos histológicos de tumores epiteliais do ovário (OMS, 2014). A) carcinoma seroso de alto grau; B) carcinoma seroso de baixo grau; C) carcinoma de células claras; D) carcinoma mucinoso; E) carcinoma endometrióide; F) carcinoma seromucinoso

Todos os tipos histológicos referidos, com exceção do tipo indiferenciado, são ainda subdivididos em neoplasias benignas, *borderline* e malignas, consoante as características em microscopia ótica. Os tumores benignos são geralmente do tipo seroso e mucinoso, afetando mulheres na faixa etária entre os 20 e os 60 anos. Apresentam-se predominantemente quísticos e podem ser unilaterais ou bilaterais, sendo este último mais frequentemente para o tipo seroso.

Os tumores *borderline* apresentam aspeto histológico habitualmente característico das neoplasias malignas, nomeadamente atipia citológica, invasão focal do estroma e disseminação intra-peritoneal e em gânglios linfáticos. Porém, e sobretudo quando só são analisados os tumores *borderline* que não pertencem ao tipo seroso, estes apresentam um excelente prognóstico aos 10 anos de seguimento clínico, após cirurgia completa.



As neoplasias epiteliais malignas (carcinomas) são a principal causa de morte por CO (90%) e são raras antes dos 35 anos de idade [47,72,73]. O subtipo histológico mais frequente é o adenocarcinoma, variante papilar seroso, frequentemente associado a anéis concêntricos de calcificações (psamomas) e à elevação sérica do marcador tumoral CA 125. O carcinoma endometrióide do ovário é semelhante ao carcinoma do endométrio, surgindo muitas vezes de forma síncrona e em estádios precoces. Os tumores mucinosos são habitualmente de maiores dimensões, podendo atingir os 20 cm de diâmetro. Macroscopicamente, apresentam áreas de hemorragia, necrose e quantidades variáveis de muco. Ocasionalmente, é excretada mucina para a cavidade peritoneal causando o pseudomixoma peritoneal. Caracteristicamente, estas neoplasias podem cursar com valores normais de CA 125, sendo necessário realizar o diagnóstico diferencial com os tumores primários do apêndice. Os tumores mucinosos comportam-se habitualmente como tumores quimioresistentes e tipicamente não se associam às mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. O carcinoma de células claras é um tumor menos frequente mas associa-se claramente a um pior prognóstico, apresenta padrões de quimioresistência e condiciona por vezes quadros de hipercalcemia [23,67]. As variantes mais raras, nomeadamente os tumores de Brenner, são habitualmente unilaterais, representam menos de 1% das neoplasias epiteliais do ovário. Os tumores indiferenciados apresentam um comportamento clínico de grande agressividade.

Os tumores dos cordões sexuais e do estroma correspondem a um grupo de tumores muito variado, em que o subgrupo dos tumores do estroma ovárico “puros” é o mais frequente (9% de todos os tumores do ovário), apresentando geralmente comportamento benigno. Ainda neste grupo de tumores, os tumores de células da granulosa apresentam frequentemente comportamento agressivo e correspondem a 1% da totalidade dos tumores ováricos.

Relativamente ao grupo das neoplasias germinativas, o teratoma maduro quístico é muito frequente (32% de todos os tumores do ovário) embora os restantes tumores germinativos, quer benignos quer malignos, sejam raros representando apenas 3-5% de todos os casos de carcinoma do ovário [23,74].

#### **1.2.6. Estadiamento**

O estadiamento do CO é cirúrgico, estando definido internacionalmente qual a metodologia de realização. Na cirurgia deve ser efetuado, sempre que possível, a

exérese total da massa tumoral, e implica para um estadiamento correto da doença, histerectomia total com anexectomia bilateral, omentectomia, biópsia das goteiras parietocólicas, gânglios linfáticos pélvicos e lomboaórticos e citologia das cúpulas diafragmáticas e do lavado peritoneal. O estadiamento é feito segundo os critérios da FIGO (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics*), pelo que recentemente foi realizada uma revisão a esta classificação [75].

Só poderá ser aceite outro estadiamento que não cirúrgico em casos de doença considerada irressecável ou se houver contra-indicação cirúrgica, sendo que nestes casos são aceitáveis os dados fornecidos pelos exames radiológicos.

A TC ou ressonância magnética (MRI), apesar de não serem de grande utilidade no diagnóstico de CO precoce, permitem em estadios mais avançados estabelecer um planeamento da cirurgia e ainda identificar os critérios de irressecabilidade do tumor em cerca de 70 a 90% dos casos. A capacidade de deteção de implantes peritoneais em ambos os exames é dependente da sua localização, tamanho e presença de ascite. Contudo, a TC é a modalidade de imagem de escolha com vista ao estadiamento do CO já que é indispensável na avaliação pré-operatória no sentido da otimização da cirurgia de citorredução máxima ou, pelo contrário, na ajuda de decisão de quimioterapia neoadjuvante.

O exame extemporâneo é importante na definição do tipo e extensão da cirurgia a realizar, permitindo um diagnóstico preliminar rápido e a definição da estratégia terapêutica cirúrgica. No caso particular das doentes com suspeita clínica de tumor do ovário, tem como principal objetivo determinar a natureza tumoral da lesão e distinguir entre tumor ovárico benigno, *borderline* ou maligno [76]. Adicionalmente, pode ser usado para distinguir entre tumor primário do ovário e metástase, assim como confirmar a presença de disseminação peritoneal. Assim, perante a confirmação de tumor do ovário benigno pode ser realizada uma cirurgia conservadora, enquanto perante o diagnóstico de CO se considera o estadiamento cirúrgico que deverá passar pela citorredução máxima da doença tumoral. De referir que o resultado do exame extemporâneo apresenta carácter provisório. O diagnóstico definitivo é elaborado após fixação, inclusão em parafina de vários fragmentos e eventual execução de outras técnicas tais como estudo de imuno-histoquímica [77].

A disseminação do carcinoma epitelial do ovário pode ocorrer através de todas as vias de propagação conhecidas na disseminação das neoplasias malignas, isto é, a via linfática, hematogénica, transcavitária e por contiguidade. No entanto, a via transcavitária é, sem dúvida, a via clinicamente mais relevante e que condiciona, na grande maioria dos casos, o prognóstico das doentes [64,78].

A disseminação para a cavidade peritoneal é um fenómeno precoce da história natural da doença, dado que as células malignas seguem o trajeto do líquido peritoneal, obedecendo às variações da pressão intra-abdominal. As células do ovário caracterizam-se por serem células dependentes de ancoragem, isto é, em que apenas sobrevivem quando se encontram aderentes à matriz extracelular ou estão em contacto com células vizinhas. Contudo, quando as células tumorais do ovário são capazes de esfoliar para a cavidade peritoneal, conseguem evitar a *anoikis* (processo de apoptose desencadeada pela perda de ligação com a matriz extracelular) e sobreviver mesmo isoladamente. Nesta forma, conseguem sobreviver e disseminar-se no peritoneu, depositando-se segundo a distribuição do fluxo passivo do líquido peritoneal, predominantemente nas goteiras parieto-cólicas, superfícies diafragmáticas, cápsula do fígado, superfície do intestino e no omento. A adesão das células malignas ao peritoneu precede a invasão local e a metastização secundária, nomeadamente para a cavidade pleural por poros transdiafragmáticos (estadio IV). A via transcavitária parece estar relacionada com a predileção das células neoplásicas pela cavidade abdominal (*homing*) em detrimento de depósitos noutros órgãos como o fígado, pulmões, cérebro ou osso (raramente nestas últimas duas localizações) [64,78].

A via de disseminação por contiguidade é também importante e interessa a órgãos como a trompa, útero, anexo contralateral e serosas da bexiga, reto e fundo de saco de Douglas. A forma iatrogénica por contiguidade, por exemplo, para a parede abdominal (cirurgia ou paracentese) é menos frequente. Por via linfática e sanguínea a disseminação é mais rara e ocorre habitualmente em estadios mais avançados da doença.

### **1.2.7. Fatores de Prognóstico**

Um elevado número de fatores clínico-patológicos tem sido implicado na determinação do prognóstico das doentes com CO. Os parâmetros estadio, tamanho do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação e tumor residual após cirurgia são considerados fatores de prognóstico clássicos. Mais especificamente, o volume de doença residual após cirurgia é considerado um dos principais fatores de prognóstico, capaz de influenciar a resposta à quimioterapia e a sobrevivência [79-83]. A correta classificação histológica das neoplasias epiteliais do ovário é especialmente

importante uma vez que este é um fator de prognóstico independente e é orientador da conduta terapêutica [28,84,85].

O estado geral da doente (ECOG) e a idade são também fatores com importância no prognóstico e fundamentais na decisão de tratamento médico [67,84].

Inúmeros estudos têm sido realizados de forma a avaliar o significado clínico de alterações moleculares no CO. Contudo, os resultados obtidos até ao momento não permitem aceitar universalmente um biomarcador de prognóstico, apesar de ter sido recentemente aprovada a pesquisa de mutações dos genes *BRCA* como biomarcador preditivo para CO. No entanto, a relevância clínica dos biomarcadores de prognóstico parece variar em função do tipo histológico e as alterações moleculares associadas carecem de estudos que validem a sua utilidade clínica de forma independente [28,86].

Recentemente, o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias genómicas têm permitido a descrição de assinaturas moleculares integradas em modelos de prognóstico e preditivos de resposta à terapêutica. Nomeadamente, o projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), para além de confirmar a importância dos genes *BRCA* na sobrevivência das doentes com carcinoma seroso do ovário, permitiu descrever uma assinatura transcricional associada ao prognóstico [87]. Outros estudos propuseram ainda variadas assinaturas moleculares, nomeadamente o modelo prognóstico CLOVAR, no qual se destaca a assinatura de 23 genes envolvidos na reparação dos danos no DNA induzidos pelos platinos, que são preditivos da resposta à terapêutica nos carcinomas serosos do ovário [88].

## **1.2.8. Tratamento**

### **1.2.8.1. Tratamento de primeira linha**

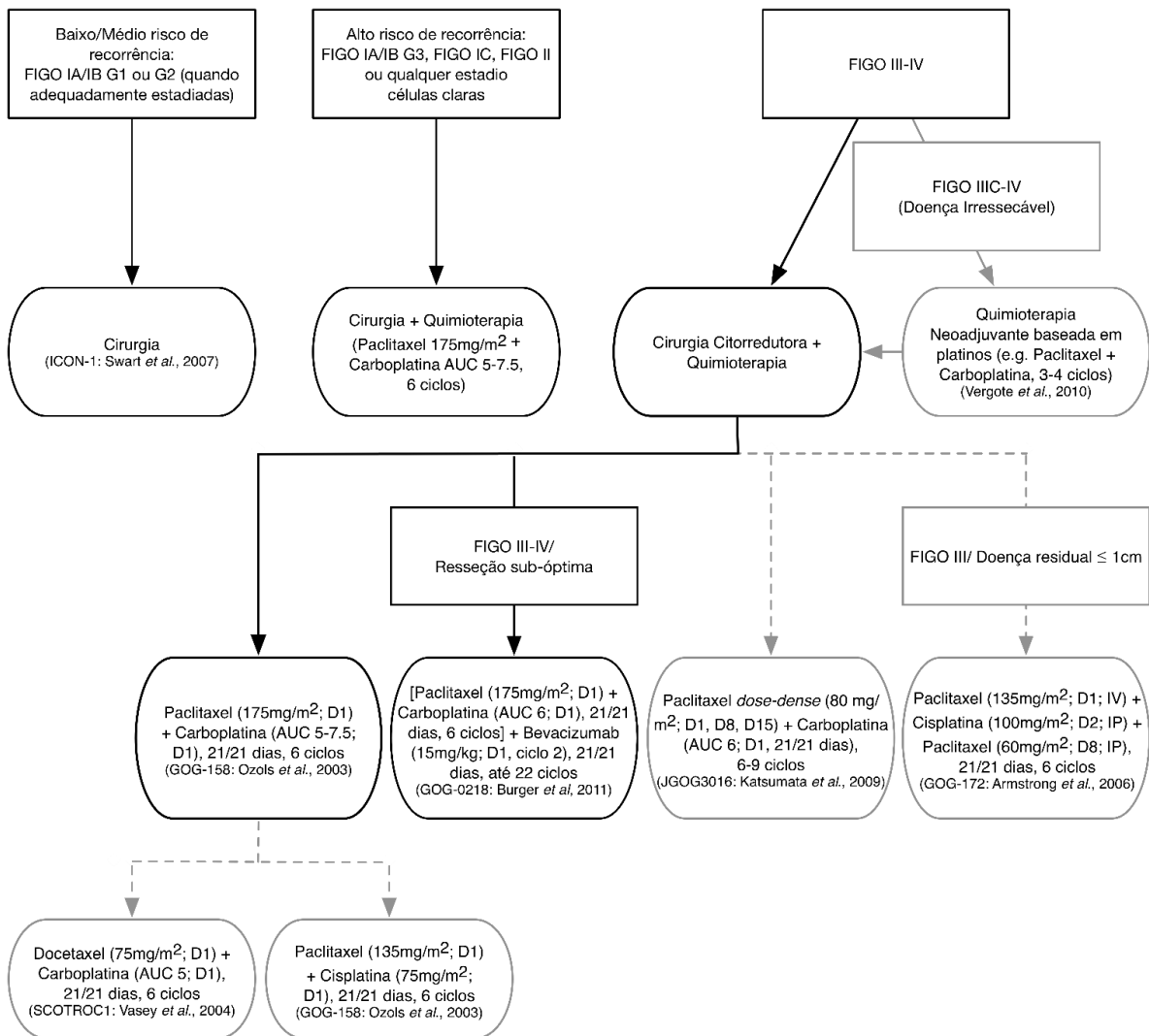
A estratégia terapêutica do carcinoma epitelial do ovário baseia-se na cirurgia de citorredução e estadiamento, seguida de quimioterapia adjuvante com platinos em associação com os taxanos [28,56]. A extensão da cirurgia é determinante para a sobrevivência e resposta à quimioterapia das doentes com CO, já que estes parâmetros variam significativamente dependendo do sucesso (cirurgia óptima ou sub-óptima) do ato cirúrgico [83].

A terapêutica sistémica com agentes anti-neoplásicos assume um papel fundamental no tratamento desta neoplasia estando preconizada para a maioria das

situações, incluindo os estadios iniciais com critérios histopatológicos de mau prognóstico (FIGO IA/IB G3, FIGO IC, FIGO II ou histologia de células claras em qualquer estadio). Por outro lado, as doentes com CO em estadio IA ou IB G1 ou G2, desde que adequadamente estadiadas, apresentam um melhor prognóstico e podem ser submetidas a cirurgia sem necessidade de quimioterapia adjuvante [89-91] (Figura 3). Para estas doentes, o prognóstico é positivo, com taxas de sobrevivência entre 80 e 95% quando adotado o tratamento recomendado [92].

As últimas décadas trouxeram avanços importantes no tratamento médico do CO. A associação do paclitaxel ao platino demonstrou prolongar quer a sobrevivência livre de progressão (SLP) quer a sobrevivência global (SG) nas doentes em estadios avançados quando comparada com os anteriores regimes de tratamento sem taxanos. A SG mediana nas doentes em que a cirurgia citoredutora não foi ótima (doença residual mínima >1 cm de diâmetro) foi de 37 meses para as doentes tratadas com paclitaxel e cisplatina e 25 meses para as que receberam ciclofosfamida e cisplatina [93]. Globalmente, a inclusão do paclitaxel no esquema de quimioterapia adjuvante resultou numa redução de 30% no risco de morte [93-95].

A recomendação atual para a quimioterapia de primeira linha a utilizar no CO epitelial, com exceção dos estadios precoces com critérios de baixo risco de recorrência, é a combinação de um platino (Cisplatina ou Carboplatina) com um taxano-Paclitaxel [28]. Assim, foi estabelecido como padrão de quimioterapia adjuvante primária na doença avançada, após cirurgia de citorredução, a combinação endovenosa de Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) e Carboplatina (AUC 5-7.5), de 21/21 dias, por 6 ciclos (Figura 3) [28,93,94,96-98].



**Figura 3.** Fluxograma representativo das opções terapêuticas para o tratamento de primeira linha do carcinoma epitelial do ovário, com indicação do ensaio clínico que determinou a sua aprovação.

Este esquema de tratamento é o *standard* há mais de 15 anos, e os ensaios clínicos realizados na última década para a introdução de um terceiro agente, como no ensaio clínico ICON-5/GOG182, não demonstrou qualquer melhoria na sobrevivência destas doentes [99]. Para as doentes que desenvolvam alergia ou toxicidade ao Paclitaxel, nomeadamente reações de hipersensibilidade ou neurotoxicidade, a combinação de Docetaxel/Carboplatina ou Doxorrubicina Lipossômica Peguilada/Carboplatina pode ser considerada como alternativa [97,100]. A combinação de Cisplatina e Paclitaxel é igualmente efetiva mas associada a maior toxicidade e menor comodidade na administração estando atualmente reservada para as doentes que desenvolveram reacções de hipersensibilidade à carboplatina [28,96].

A adição de Bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, está recomendada para doentes com CO avançado, com características de mau

prognóstico (estadio IV ou resseção sub-ótima), devendo ser administrado concomitantemente com o Paclitaxel/Carboplatina (após o primeiro ciclo) e ser mantido após os 6 ciclos de quimioterapia. Relativamente à dose e duração da manutenção, os resultados não são claros embora um benefício similar seja obtido com a administração de 7,5 mg/kg e 15 mg/kg durante 12 e 15 meses, respetivamente [101,102]. Apesar de não estar recomendado nos Estados Unidos da América e não ser consistentemente utilizado na Europa, o Bevacizumab foi aprovado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) na dose de 15 mg/kg, concomitantemente com Carboplatina e Paclitaxel, durante 22 ciclos (15 meses) [28,101].

Com o intuito de melhorar a eficácia do tratamento primário no CO, vários ensaios clínicos avaliaram a adição de um terceiro agente citotóxico (como Epirrubicina, Topotecano, Gemcitabina ou Doxorubicina Lipossômica Peguilada) ao esquema de primeira linha, mas sem benefício em nenhum subgrupo de doentes tratadas com esses tripletos [28,54]. Adicionalmente, o ensaio japonês JGOG-3016 avaliou o impacto de um esquema terapêutico *dose-dense* (Paclitaxel administrado semanalmente; 80mg/m<sup>2</sup>) na efetividade da quimioterapia para o CO. Os resultados foram promissores relativamente aos benefícios na SLP e SG embora associados com elevada toxicidade, sobretudo mielotoxicidade. Apesar de ser um ensaio com potencial impacto na prática clínica as diferenças farmacogenómicas entre as populações japonesas e caucasianas tornaram necessária a confirmação destes resultados para a população caucasiana. O estudo europeu MITO-7 não confirmou estes resultados em doentes caucasianas, não demonstrando benefício na SLP e SG com o regime de Carboplatina (AUC 2) e Paclitaxel (60 mg/m<sup>2</sup>) semanal [103]. Na ausência de novos dados, a administração *dose-dense* do Paclitaxel apenas poderá ser considerada como opção e não como *standard* [28].

Evidências clínicas demonstram que, apesar da elevada taxa de resposta ao tratamento de primeira linha, uma grande parte das doentes com CO irá desenvolver recidiva da doença que, na maioria dos casos, é confinada à cavidade abdominal. Com base nesta característica particular, a administração intraperitoneal de quimioterapia foi associada com melhoria na SLP e SG em estudos randomizados de fase III (GOG 104, 114 e 172), em associação com a quimioterapia endovenosa [104,105]. No entanto, este tratamento não é amplamente utilizado na prática clínica devido à sua elevada toxicidade [28]. A quimioterapia administrada diretamente na cavidade abdominal pode ser também realizada no ato operatório, usando a técnica HIPEC (quimioterapia intraperitoneal hipertérmica). A justificação para a utilização desta

última abordagem terapêutica tem por base os estudos que demonstraram que altas temperaturas permitem ultrapassar a resistência à cisplatina, assistindo-se a um aumento da penetração e acumulação celular deste fármaco quando administrado intraperitonealmente em associação à hipertermia [106]. Apesar de representar uma estratégia promissora, o uso de HIPEC permanece controverso, aguardando-se o resultado de ensaios clínicos em curso.

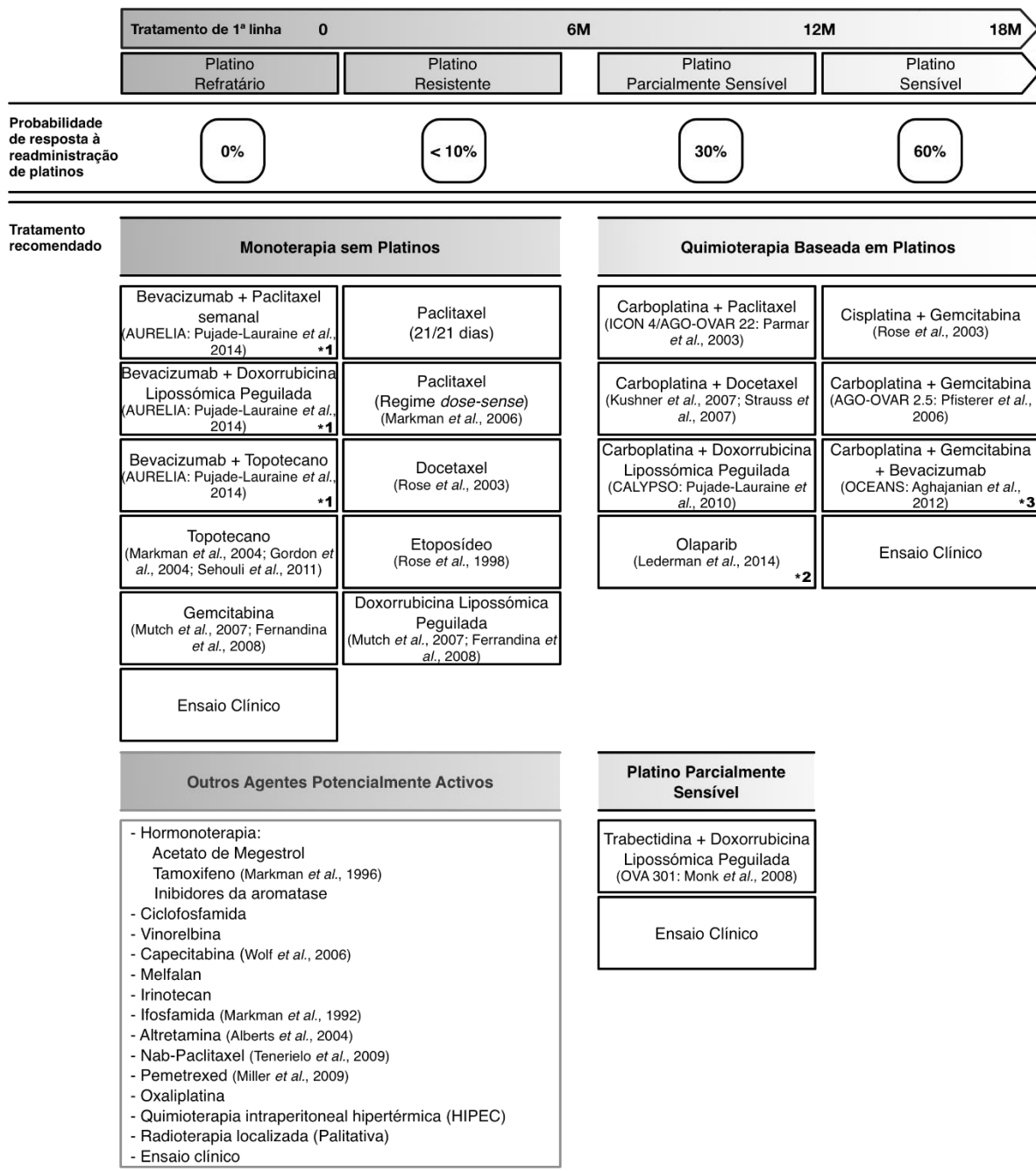
Relativamente à quimioterapia neoadjuvante no CO, inúmeros estudos tem demonstrado que a mesma é viável para doença avançada (estadio IIIC - IV), em que a doença é considerada irressecável ou não é possível a citorredução primária ótima pela extensão da doença e/ou por comorbilidades que aumentam o risco cirúrgico [80]. A realização de quimioterapia neoadjuvante está associada a algumas vantagens, incluindo a redução do tamanho e extensão do tumor, aumento da taxa de citorredução ótima, possibilita uma cirurgia menos extensa e com menor morbi/mortalidade, melhora o *performance status* das doentes antes da cirurgia e permite avaliar a quimiossensibilidade do tumor. A quimioterapia a aplicar deverá basear-se em platinos (frequentemente numa associação Paclitaxel/Carboplatina) e não está preconizado realizar mais do que 3 a 4 ciclos para evitar a emergência de clones resistentes [28,54,80].

A avaliação de resposta à quimioterapia é efetuada por TC segundo os critérios de RECIST, complementada pela medição sérica do CA 125, seguindo os critérios do *Gynecologic Cancer InterGroup* (GCIg) [107].

#### **1.2.8.2. Tratamento da recorrência**

A estratégia de cirurgia de ressecção máxima combinada com quimioterapia adjuvante permite obter remissão clínica completa em cerca de 75% dos casos de carcinoma epitelial do ovário. No entanto, após 12 a 18 meses, aproximadamente 75% destas doentes desenvolve doença recorrente havendo necessidade de instituir terapêutica de segunda linha, sendo a recidiva de CO definida de acordo com o intervalo livre de progressão após o fim do tratamento inicial (Figura 4) [28,74,96,108-110].





\*1 Doentes submetidos previamente até 2 linhas terapêuticas  
 \*2 Doentes com mutação germinativa BRCA  
 \*3 Doentes que não tenham sido submetidas previamente a Bevacizumab

**Figura 4.** Fluxograma representativo das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento do carcinoma epitelial do ovário recorrente, definida de acordo com o intervalo livre de platinos

O prognóstico e a probabilidade de resposta à terapia de segunda-linha (e subsequentes linhas) dependem do intervalo livre de progressão após o último ciclo da linha anterior de quimioterapia. Esta categorização define “platino-refratário” doentes com progressão durante a terapia ou nas 4 semanas após o último ciclo; “platino-resistente” cuja progressão se verifica nos 6 meses após a terapia à base de platinos; “parcialmente sensível” em que a progressão ocorre entre os 6 e os 12

meses; “platino-sensível” cuja progressão ocorre num intervalo superior a 12 meses [111]. Deverá ser ressaltado que estas categorias são baseadas em estudos observacionais e que a categorização é probabilística, com a probabilidade de resposta a ser uma variável contínua. Para além disso, a categoria “platino-resistente/refratário” compreende doentes cuja doença recorre após uma ou várias linhas de tratamento.

O comportamento biológico dos tumores nestes grupos pode ser bastante variável, com diferentes taxas de resposta e distribuição de sintomas com diferentes necessidades de tratamento. Se a recidiva ocorre seis meses após se ter completado a quimioterapia de primeira linha, dever-se-á realizar um regime terapêutico com base em platinos, uma vez que a doença é considerada platino-sensível. Para as doentes com recidiva sensível aos platinos existem diversas estratégias terapêuticas disponíveis pelo que, uma vez que este fenómeno pode ocorrer repetidamente, permite a seleção de diferentes combinações terapêuticas [28]. Contudo, o intervalo de tempo até à recidiva seguinte será progressivamente mais curto até que o tumor se torne virtualmente resistente a estes agentes [74].

A re-administração de platinos está associada a uma taxa de resposta a rondar os 30%, sendo que esta é tanto maior quanto maior o intervalo livre de progressão registado. As opções de tratamento disponíveis para a recidiva do CO sensível à platina baseiam-se, idealmente, na escolha de um regime de associação de platinos com Paclitaxel, Gemcitabina (com ou sem Bevacizumab) ou ainda com Doxorrubicina Lipossómica Peguilada [112-116] (Figura 4). A opção terapêutica a selecionar deverá ter em conta o perfil de toxicidade de cada um dos esquemas, as toxicidades residuais dos regimes prévios e as preferências da própria doente.

A administração de Bevacizumab em combinação com a Carboplatina/Gemcitabina, seguida de manutenção até à progressão ou toxicidade, foi aprovada pela EMA como tratamento de primeira linha da recidiva platino-sensível (em doentes *naive* de Bevacizumab), estando associado a melhorias na SLP embora sem impacto na SG [28,117].

Doentes com intervalo livre de progressão entre os 6 e 12 meses, consideradas como parcialmente sensíveis, beneficiam ainda de terapêutica de segunda linha baseada em platinos embora com menor efeito terapêutico (Figura 4). Para estas doentes o uso de Trabectedina associada à Doxorrubicina Lipossómica Peguilada poderá também ser uma opção, de acordo com os resultados do estudo OVA 301, provavelmente pelo restabelecimento da sensibilidade aos platinos devido ao prolongamento artificial do intervalo livre de platinos [28,118]. No entanto, em

Portugal, atualmente a Trabectedina está aprovada apenas em doentes com antecedentes de hipersensibilidade aos platinos.

Nas recidivas em que o intervalo livre de doença for inferior a seis meses, o tumor é definido como resistente aos platinos devendo-se instituir outro esquema de tratamento, estando preconizado regimes de monoterapia [28,95,119]. A terapêutica das doentes com CO platino-resistente/refratário visa essencialmente a qualidade de vida e controlo de sintomas sendo, geralmente, associado a mau prognóstico com uma SG reduzida (geralmente inferior a 12 meses) [28]. A cirurgia como alternativa terapêutica nestes casos deverá ser ponderada apenas na necessidade de palição de sintomas. Esquemas de monoterapia com Paclitaxel (preferencialmente semanal), Doxorubicina Lipossómica Peguilada, Gemcitabina, Topotecano, entre outros, demonstraram taxas de resposta semelhantes (não superiores a 15%) e SLP entre 3 a 4 meses [28,120-127]. Assim, a opção por um destes fármacos deverá ser tomada com base nas terapêuticas previamente realizadas, perfis de toxicidade, conveniência de administração, custos e opção da doente. Os esquemas terapêuticos de combinação não melhoraram significativamente as taxas de resposta nem a sobrevivência para a doença platino-resistente, quando em comparação com esquemas de monoterapia, acrescentando toxicidade [28,95].

Recentemente, foram alcançados resultados promissores com tratamentos biológicos de manutenção, nomeadamente com agentes anti-angiogénicos (Bevacizumab, Pazopanib e Trebananib) e com inibidores da PARP (*Poly(ADP-ribose) Polymerase*; Olaparib, Niraparib, Rucaparib) [128]. O Bevacizumab foi o primeiro anti-angiogénico a demonstrar benefício clínico na recidiva platino-sensível e platino-resistente, concomitantemente com quimioterapia e como terapêutica de manutenção. Tal como anteriormente referido, de acordo com os resultados publicados no ensaio OCEANS, a EMA aprovou a associação do Bevacizumab com Carboplatina/Gemcitabina para doentes com recidiva do CO sensível aos platinos, desde que não tenham sido previamente submetidas a este anti-angiogénico [117].

De acordo com os resultados publicados no estudo AURELIA, a adição de Bevacizumab à quimioterapia (Paclitaxel semanal, Doxorubicina Lipossómica Peguilada ou Topotecano) de doentes com CO platino-resistente (submetidas previamente até duas linhas terapêuticas) demonstrou estar associada com um aumento na SLP, nas taxas de resposta avaliadas pelo RECIST e qualidade de vida, embora sem evidência de impacto na SG [129]. Assim, o uso de Bevacizumab pode ser uma alternativa neste subgrupo de doentes até ao desenvolvimento de toxicidade ou progressão (Figura 4).

Para além do Bevacizumab, é ainda referenciado como terapêutica alvo na recorrência de CO o Olaparib. Este agente surge como o primeiro inibidor PARP a ser autorizado pela EMA para tratamento de manutenção do CO recorrente em doentes portadoras de mutações nos genes *BRCA*, com resposta parcial ou completa à quimioterapia baseada em platinos. Os resultados obtidos demonstraram uma extensão de 6,9 meses na SLP nas doentes portadoras de mutações *BRCA* tratadas com Olaparib (11,2 *versus* 4,3 meses; HR, 0,18; 95% CI, 0,10-0,31;  $P < 0,0001$ ) embora o impacto relativamente à SG não seja positivo [130]. As taxas de resposta a esta terapia estão relacionadas com o intervalo livre de platinos, sendo de 69,2%, 45,8% e 23,1% para a doença sensível, resistente e platino-refratária, respetivamente [131]. A administração de Olaparib permite adicionalmente estender o tempo até uma terapia subsequente, sugerindo que o tratamento com este agente não afeta de forma adversa o tratamento da recorrência.

O tratamento da recidiva do CO não tem intuito curativo, embora algumas doentes apresentem sobrevivências prolongadas com várias remissões da doença, obtendo benefício clínico com múltiplas linhas de tratamento. A escolha do tipo e duração do tratamento na recidiva é influenciada por vários fatores, alguns deles dependentes da própria doença (tipo e localização da recorrência, possibilidade de tratamento cirúrgico, resposta e duração da mesma à quimioterapia anterior) e outros inerentes ao doente (vontade, *performance status* e toxicidade residual de tratamentos anteriores). A duração ótima do tratamento da recorrência ainda não se encontra estabelecida na medida em que alguns estudos indicam a realização máxima de 6 ciclos de quimioterapia, à semelhança do tratamento adjuvante, enquanto outros, sobretudo aqueles que incluem outro tipo de fármacos, permitem tratamento até progressão ou toxicidade [95].

Com a existência de várias alternativas de tratamento que permitem abordagens sequenciais e da emergência de novas terapêuticas dirigidas, na maioria bem toleradas, é possível efetuar regimes terapêuticos mais prolongados associados a um controlo sintomático importante e com impacto positivo na qualidade de vida. Na prática clínica, na ausência de toxicidade limitante, o tratamento poderá e deverá ser mantido até ser atingida resposta máxima. Idealmente, os cuidados paliativos deveriam ser iniciados, concomitantemente com terapêuticas antineoplásicas, sempre que a sobrevivência esperada seja inferior a 6 meses [132].

### 1.2.8.3. Abordagens terapêuticas emergentes

A combinação de platinos e taxanos é considerada um marco no tratamento do CO avançado, permanecendo ainda hoje como terapia de primeira linha *standard*. Contudo, a melhoria das taxas de resposta à quimioterapia revelou-se desapontante, pelo que a introdução de novas estratégias de tratamento na recorrência foi determinante para aumentar a sobrevivência a longo prazo. A recente adoção de terapias moleculares com agentes dirigidos à inibição da angiogénese e reparação do DNA surge como um avanço no tratamento médico desta neoplasia, com vista a retardar a progressão e o re-tratamento com quimioterapia [83]. Inclusivamente, a publicação de resultados positivos com a utilização do Bevacizumab, quer no tratamento de primeira linha quer na doença recorrente sensível e resistente aos platinos, foi a prova de conceito da importância da inibição da angiogénese no sucesso do tratamento do CO [101,117,129].

Relativamente à inibição da reparação do DNA, foi inicialmente sugerido que os inibidores da PARP, uma enzima envolvida na resposta às quebras de cadeia simples no DNA, poderiam ser utilizados de forma a potenciar o efeito da quimioterapia [133]. Contudo, a observação de que a sobrevivência das células tumorais com mutações homocigóticas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* é significativamente menor perante a utilização de inibidores PARP levou ao desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para CO [134,135]. O racional molecular para esta associação tem por base o facto de células com proteínas BRCA defetivas não serem capazes de reparar quebras de cadeia dupla no DNA pela via da recombinação homóloga (HR, *Homologous Recombination*), dependendo de outras vias para reparar os danos, nomeadamente da via por excisão de bases (BER, *Base Excision Repair*) na qual a PARP está envolvida. Nesta via, a PARP tem como função detetar a existência de quebras de cadeia simples e ativar proteínas efetoras para que ocorra a reparação dos danos. Desta forma, deficiências na HR (HRD, *Homologous Recombination Deficiency*), como na presença de mutações nos *BRCA*, em concomitância com a inibição da PARP resulta na morte celular devido à acumulação excessiva de danos não-reparados. Este fenómeno é designado por letalidade sintética e ocorre quando dois defeitos não letais são combinados culminando na morte celular [135]. A ocorrência deste mecanismo é ainda valorizada pela capacidade de proteção contra a toxicidade dos inibidores uma vez que as células não tumorais são capazes de reparar os danos pela via HR sendo, por isso, menos suscetíveis à ocorrência de eventos adversos.

À medida que o conhecimento genético e molecular tem vindo a aumentar, os estudos com inibidores da PARP estão a tornar-se abrangentes de forma a incluir um maior grupo de tumores do ovário. De acordo com os dados publicados pelo projeto TCGA, a presença de mutações nos genes *BRCA* é identificada em cerca de 20% dos carcinomas serosos de alto grau e cerca de 50% destes tumores apresentam fenótipo HRD positivo, mesmo na ausência de história familiar de cancro da mama/ovário [87,133].

Para além dos excelentes resultados obtidos com o tratamento com Olaparib no subgrupo de doentes portadores de mutações *BRCA*, o estudo publicado Ledermann *et al* (2014) também demonstrou que a inibição da PARP é efetiva no grupo de doentes *BRCA wild-type*, embora numa menor extensão, aumentando o tempo de SLP (7,4 *versus* 5,5 meses; HR, 0,54; 95% CI, 0,34-0,85; *P* = 0,0075) [130]. Os resultados promissores atingidos com o Olaparib estimularam o desenvolvimento de novos inibidores da enzima PARP, incluindo o Niraparib e o Rucaparib [136,137]. Os ensaios clínicos de manutenção a serem desenvolvidos com ambos os agentes estão a incluir doentes *BRCA wild-type* de forma a testar o efeito dos inibidores da PARP nesta população, incorporando adicionalmente um teste molecular para HDR. Nomeadamente, para doentes com recorrência sensível aos platinos, a duração média da SLP é significativamente superior para os doentes sujeitos a Niraparib, quando comparado com o placebo, independentemente da presença/ausência de mutações germinativas nos *BRCA* ou *status* HRD [137].

Para além disso, os ensaios clínicos a serem desenvolvidos avaliam não só o impacto dos inibidores PARP na manutenção da recorrência, como no ensaio SOLO2, mas também como estratégia de manutenção no tratamento de primeira linha, como no SOLO1. Adicionalmente, o ensaio GOG 3005 avalia a adição do inibidor da PARP Veliparib com a terapia de primeira linha (Carboplatina/Paclitaxel) bem como a sua adição à quimioterapia e posterior manutenção.

Foi colocada ainda a hipótese de uma possível sinergia entre a utilização de inibidores PARP e inibidores de outras vias de sinalização, como os anti-angiogénicos. De facto, estudos pré-clínicos demonstraram um efeito aditivo na associação de inibidores destas duas vias uma vez que a hipoxia conduz à diminuição da expressão de proteínas de reparação do DNA, aumentando desta forma a sensibilidade para os inibidores PARP [138,139]. Assim, um ensaio clínico de fase I combinou um inibidor do domínio tirosina cinase do receptor VEGF, o Cediranib, com o Olaparib, atingindo uma taxa de resposta objetiva de 44% na doença recorrente [140]. Os resultados deste estudo potenciaram o desenvolvimento de um estudo randomizado de fase II, no qual

foi observada um aumento da SLP e da taxa de resposta objetiva para a combinação Cediranib/Olaparib quando comparado com o Olaparib isoladamente (17,7 *versus* 9,0 meses; HR, 0,42; 95% CI, 0,23-0,76;  $P = 0,005$  e 79,6% *versus* 47,8%; OR, 4,24; 95% CI, 1,53-12,22;  $P = 0,002$ ) em doentes com recorrência sensível aos platinos [141]. Embora os resultados apresentados neste estudo devam ser interpretados com precaução, pelo baixo número de doentes recrutados, os resultados são de elevado interesse ao sugerirem uma ação sinérgica na utilização concomitante de inibidores da angiogénese/reparação do DNA. Desta forma, inúmeros ensaios clínicos que explorem estas vias encontram-se em desenvolvimento, quer isoladamente quer em combinação, para terapia de primeira linha ou manutenção, com a perspetiva de estender as oportunidades para o tratamento do CO.

### **1.2.9. A Farmacogenómica aplicada ao tratamento do carcinoma do ovário**

Na prática clínica da Oncologia Médica, observa-se uma grande heterogeneidade da resposta e toxicidade aos agentes anti-neoplásicos. Existem subgrupos de doentes que, apesar de se apresentarem num estadio precoce da doença, possuem elevado risco de progressão tumoral. Nestes casos, a cirurgia e os fatores de prognóstico clássicos não permitem prever corretamente o comportamento biológico destes tumores. Torna-se, por isso, fundamental a pesquisa de novos marcadores de prognóstico biológicos, capazes de identificar as doentes numa fase inicial da doença, mas com risco de progressão e metastização. Para este grupo, uma terapia dirigida poderia ser selecionada mais precocemente. De igual forma, a administração da mesma dose de um citostático numa população de doentes resulta numa diversidade de toxicidade que vai desde a inocuidade até ao surgimento de eventos letais [108].

O tratamento sistémico do CO envolve citotóxicos convencionais, quer no tratamento (neo)adjuvante quer em contexto paliativo. A maioria dos tumores do ovário responde à quimioterapia à base de platinos mas a duração da resposta é bastante variável e frequentemente insatisfatória. Na atual era da terapêutica individualizada, e tendo em atenção a heterogeneidade do CO, deverão ser investigados biomarcadores que permitam identificar as doentes que mais irão beneficiar de determinado tratamento. Algumas doentes com CO não apresentam resposta ao tratamento sistémico e, a grande maioria, recidiva após uma resposta

inicial, pelo que a investigação de mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida alcançou mais importância pela possibilidade de intervenção farmacológica [142].

A falha no sucesso das estratégias terapêuticas levou à realização de estudos genómicos, como o desenvolvido pelo projeto TCGA, para determinar o impacto de alterações genómicas e epigenómicas e, assim, identificar marcadores moleculares com influência no *outcome* clínico e possíveis alvos terapêuticos para o carcinoma do ovário. Uma das grandes conclusões obtidas com o projeto TCGA é a presença de HRD em cerca de 50% dos carcinomas serosos de alto grau, podendo representar um subgrupo com benefício no tratamento com inibidores PARP [87]. De facto, a presença de mutações nos genes *BRCA* e um fenótipo HRD positivo é fator preditivo benéfico no tratamento das doentes com inibidores da PARP, existindo, pela primeira vez, uma terapia personalizada para o CO definida por um biomarcador genético [130].

As mutações *BRCA* são atualmente reconhecidas como biomarcadores prognósticos e preditivos. Doentes portadoras destas mutações apresentam uma melhor resposta à quimioterapia (à base de platinos, não-platinos e intraperitoneal) e, conseqüentemente, melhores taxas de SLP e SG. Como biomarcadores preditivos, estão associados com a resposta aos inibidores da PARP, nomeadamente Olaparib e Niraparib [130,137]. Dados preliminares das mutações *BRCA* como biomarcadores preditivos de resposta foram também publicados para outros agentes como Doxorubicina Lipossómica Peguilada e Trabectedina [143,144].

As implicações destes avanços ainda são preliminares uma vez que o teste genético para mutações *BRCA* deverá ser generalizado para todas as doentes com tumores não-mucinosos, independentemente da idade ou história familiar. O teste deverá ser realizado ao diagnóstico, uma vez que fornece informação sobre a probabilidade de resposta à quimioterapia, e incorporado de forma sistemática na prática clínica para que as doentes com CO possam beneficiar de uma estratégia terapêutica individualizada [83].

Contudo, embora as mutações *BRCA* e o *status* HRD possam fornecer informações importantes relativamente à magnitude do benefício da terapia dirigida, estes biomarcadores podem não ser exclusivos na determinação da probabilidade de resposta e sensibilidade/resistência aos fármacos. Assim, novos marcadores genéticos e moleculares deverão ser explorados e uma melhor definição de HRD deverá ser introduzida para distinguir subgrupos de resposta à terapia.

Até à data, para além das mutações *BRCA* e do *status* HRD, a sensibilidade aos platinos permanece o melhor “biomarcador” de resposta aos inibidores PARP. A sensibilidade aos platinos correlaciona-se com a HRD e tumores sensíveis aos platinos



são mais responsivos aos inibidores da PARP que os tumores platino-resistentes, independentemente da informação genética referida [83,133]. Assim, a administração de inibidores PARP poderá ser encarada como uma possibilidade para toda a população de doentes com CO que respondam ao tratamento à base de platinos.

Assim, os estudos farmacogenómicos assumem uma grande importância nas políticas de saúde atuais onde os custos e o tratamento individualizado pretendem ser os seus pilares [14,15]. Em suma, a identificação da terapêutica sistémica ótima para cada doente passa pelo melhor conhecimento das características biológicas e clínicas dos tumores do ovário assim como de alterações genéticas e moleculares específicas de cada doente de forma a estabelecer biomarcadores com valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento.

O CO é amplamente caracterizado pela sua heterogeneidade, com uma variedade de subtipos distintos na biologia e na taxa de resposta às estratégias terapêuticas. Desta forma, atingir uma estratégia de terapêutica individualizada só será possível através da identificação de biomarcadores executáveis, validados e reproduzíveis na prática clínica, que permitam prever a probabilidade de resposta a determinado tratamento [16,145-147].

A descodificação do genoma Humano tornou evidente que os polimorfismos genéticos são a principal fonte de variabilidade individual. As alterações mais comuns no genoma consistem na variação estável de apenas um nucleótido em *loci* específicos do DNA, designados por *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Estas variações estão presentes em, pelo menos, 1% da população sendo que cada indivíduo é portador de um vasto grupo de SNPs que lhe confere um património genético único e individual [12,13,16,17]. No genoma humano estão identificados mais de 6 milhões de SNPs, podendo ocorrer em qualquer região do genoma [148,149].

Para além da importância dos SNPs na definição de grupos de risco para o desenvolvimento neoplásico e de grupos com significado prognóstico, estas variações poderão também modular a resposta a determinado tratamento. Assim, indivíduos com o mesmo diagnóstico e submetidos ao mesmo esquema terapêutico poderão apresentar respostas terapêuticas distintas, ausência ou até desenvolvimento de toxicidades.

Por isso, a identificação de biomarcadores preditivos poderá auxiliar na definição e estabelecimento de um perfil farmacogenómico de forma a individualizar a terapia com base no perfil genético individual [11,15,16]. Idealmente, de acordo com os resultados dos testes genéticos germinativos, a farmacogenómica poderá ser uma ferramenta útil na prática clínica na medida em que poderá melhorar a eficácia,

reduzir toxicidade e prever não-respondedores. Desta forma, será possível a seleção de terapias alternativas ou a realização de ajustes de dose, com importante impacto nos custos de saúde associados [15,16,150].

Até à data, o sucesso da farmacogenómica tem-se revelado transversal a todos os campos da Medicina embora a aplicação desta área possa ser de particular relevância para a Oncologia Médica. Os agentes citotóxicos utilizados geralmente afetam tanto células tumorais como não-tumorais e, por isso, apresentam um *narrow therapeutic index*, com potencial para a toxicidade. Assim, compreender o efeito do património genético individual, aliado ao conhecimento da biologia molecular dos tumores, será uma estratégia promissora para formular decisões terapêuticas mais adequadas e eficazes. Por isso, a incorporação da informação genética, nomeadamente de mutações e polimorfismos funcionais, em modelos clínicos integrados poderá ser uma abordagem relevante na definição de biomarcadores de prognóstico e preditivos do tratamento [11,15,16].

#### **1.2.9.1. Metabolismo dos fármacos e polimorfismos genéticos – o modelo das Glutathione S-Transferases**

A maioria dos xenobióticos, como os agentes terapêuticos, é de natureza lipofílica, o que facilita a passagem destes compostos através das membranas celulares e o acesso aos locais de ação. No entanto, para que sejam facilmente excretáveis pelo organismo, os compostos precisam de sofrer uma transformação enzimática, para adquirirem características hidrofílicas, num processo designado por biotransformação [151]. Este processo ocorre preferencialmente a nível hepático, resultando num aumento na capacidade de excreção dos metabolitos a nível renal e biliar. Atendendo à capacidade de reduzir a acumulação dos metabolitos a níveis tóxicos no organismo, o processo de biotransformação é essencial na manutenção da homeostase celular [151-153].

A biotransformação é catalisada por um vasto grupo de enzimas metabolizadoras, num processo geralmente dividido em três fases. As reações de Fase I envolvem a funcionalização dos metabolitos, isto é, a introdução ou exposição de grupos funcionais através de reações de oxidação, redução ou hidrólise. De uma forma geral, os metabolitos resultantes são intermediários reativos e/ou espécies reativas capazes de provocar danos nos tecidos, sendo geralmente mais tóxicos ou

carcinogénicos que o composto inicial [152]. As enzimas do citocromo P450 (CYP) são um dos grupos de enzimas envolvidas nas reações de Metabolismo Fase I.

As reações de Metabolismo de Fase II convertem os metabolitos intermediários da Fase I em produtos finais, cuja molécula resultante é geralmente menos ativa e mais hidrofílica que o seu precursor, facilitando a sua posterior excreção [151]. Nesta etapa, são características as reações de conjugação ou adição de compostos endógenos bem como metilação ou acetilação. A Glutathione S-transferase (GST) é um exemplo de enzima envolvida nesta fase. As reações de Fase I e II ocorrem essencialmente a nível hepático embora a expressão destas enzimas seja detetada em diversos tecidos [152].

A última fase, a Fase III, é caracterizada pela absorção, distribuição e excreção dos metabolitos [151]. As enzimas participantes nesta fase são expressas em muitos tecidos, como o fígado, intestino, rins e cérebro. Uma fração das enzimas transportadoras diz respeito à família enzimática ABC (*Adenosine triphosphate-binding cassette*) [152].

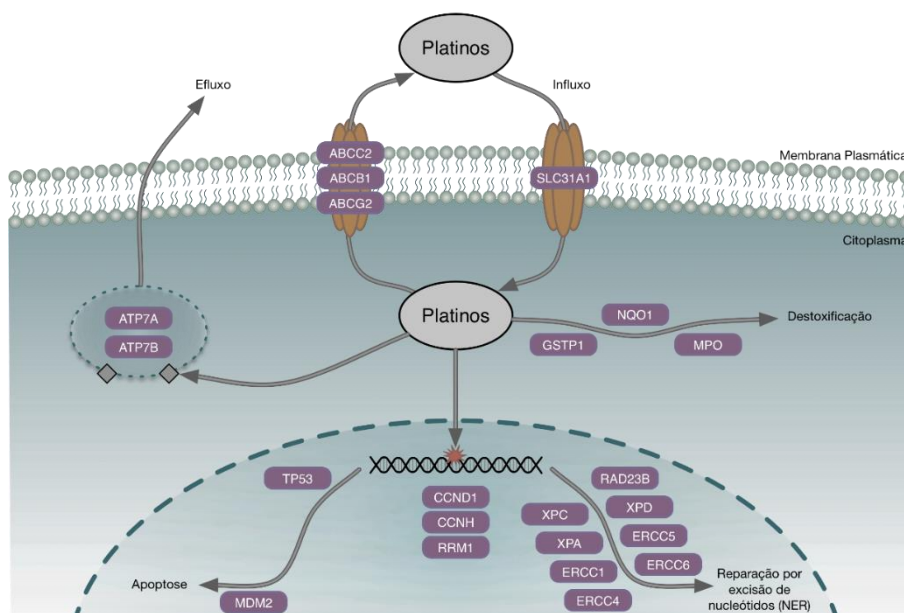
As três fases que caracterizam o processo de biotransformação são independentes e não necessitam de ser sequenciais, embora seja necessário que este processo seja altamente regulado de forma a minimizar a presença de metabolitos reativos ou tóxicos [152].

Tal como referido, as GST são uma família de enzimas metabolizadoras de Fase II, que contribuem para a destoxificação ao mediar a conjugação da glutathione com uma vasta gama de compostos tóxicos eletrofílicos, nomeadamente agentes citotóxicos como os platinos [152,154,155]. Os metabolitos associados à glutathione resultantes apresentam uma solubilidade aumentada, o que facilita a sua excreção, levando, assim, à diminuição da quantidade de metabolitos intracelulares livres. Desta forma, evita-se a exposição celular à ação reativa e tóxica de vários compostos exógenos e endógenos, muitos deles resultantes da ação das enzimas CYP [152]. As GST são expressas na maioria dos tecidos, encontrando-se em maior concentração no fígado, intestino, testículos, supra-renais e pulmões, localizando-se preferencialmente no citoplasma (>95%) e no retículo endoplasmático (<5%). Existem oito classes de GST designadas por: *alfa* ( $\alpha$ ), *mu* ( $\mu$ ), *pi* ( $\pi$ ), *teta* ( $\theta$ ), *kapa* ( $\kappa$ ), *sigma* ( $\sigma$ ), *zeta* ( $\zeta$ ) e *omega* ( $\Omega$ ) [156,157].

Por estarem envolvidas na metabolização de agentes anti-neoplásicos e carcinogénicos, as enzimas GST parecem desempenhar uma função na resistência a multidroga, pela ligação direta aos agentes farmacológicos e/ou remoção destes da célula, bem como desempenham um importante papel na libertação de radicais livres,

devido à sua atividade peroxidase dependente da glutaciona, a qual defende as células dos efeitos deteriorantes do stress oxidativo [156].

Os platinos (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) apresentam um mecanismo de ação semelhante aos agentes alquilantes pela capacidade de se ligarem de forma covalente ao DNA e levar à formação de adutos inter e intra-cadeia (Figura 5). Os danos introduzidos pelos agentes platinos apresentam uma multiplicidade de efeitos celulares, incluindo alterações na conformação da cadeia de DNA, impedindo os processos de replicação e transcrição, causando, em última instância, quebras na cadeia de DNA [74,158,159]. O reconhecimento destes danos leva à ativação dos mecanismos de reparação do DNA, promovendo a paragem do ciclo celular de forma a que os danos sejam reparados. Contudo, se a extensão dos danos for excessiva e superior à capacidade de reparação celular, os mecanismos de morte celular programada (apoptose) são posteriormente ativados [145]. Adicionalmente, os agentes platinos apresentam capacidade de interagir não só com a molécula de DNA mas também com outras moléculas bioativas, nomeadamente RNA e proteínas, e alguns organelos celulares, como as mitocôndrias, envolvidas no processo de apoptose.



**Figura 5.** Mecanismos de ação dos platinos (adaptado de Hildebrandt, 2009).

O desenvolvimento de resistência à terapia não se encontra completamente elucidada e numerosos estudos são realizados de forma a compreender os mecanismos biológicos responsáveis pela aquisição de fenótipos de resistência.

Concretamente, evidências moleculares apontam para que a resistência aos platinos possa ocorrer pela diminuição da acumulação da droga no meio intracelular, pela destoxificação dos compostos através da sua conjugação, pelo desenvolvimento de tolerância aos produtos de DNA alterados pelo platino ou pela reparação dos danos no DNA [160].

Como já foi referido, as GST promovem a destoxificação dos platinos, pela sua conjugação com a glutatona, protegendo as células dos danos celulares provocados por estes compostos [161]. Tendo em conta o papel das GST na destoxificação dos agentes citotóxicos, polimorfismos genéticos que alterem ou condicionem a atividade destas enzimas poderão apresentar um importante impacto na resposta terapêutica a estes agentes. Em particular, uma via de atividade das GST aumentada pode resultar numa rápida metabolização e excreção dos agentes terapêuticos, diminuindo a concentração celular e o potencial citotóxico dos agentes de platinos nas células tumorais e, assim, conduzir para uma resposta terapêutica desfavorável [108,162-164]. Desta forma, a sobre-expressão das GST poderá estar relacionada com o desenvolvimento de fenómenos de resistência inata ou adquirida aos derivados de platinos [165,166].

Uma percentagem significativa de indivíduos é portador de polimorfismos genéticos funcionais em dois dos genes que codificam enzimas GST (*GSTM1* e *GSTT1*), apresentando uma distribuição étnica variável [155,162,167-169]. A expressão da enzima *GSTM1* está diretamente correlacionada com a presença intacta do gene *GSTM1* (genótipo *GSTM1-wild type* (wt)) uma vez que a ausência da atividade desta enzima é o resultado de uma deleção de 15 kb que engloba a totalidade do gene (genótipo *GSTM1-nulo*). Consequentemente, os indivíduos com genótipo homozigótico *GSTM1-nulo* apresentam a ausência completa de atividade da enzima *GSTM1*, enquanto indivíduos com portadores de genótipo homozigótico *GSTM1-wt* são considerados como tendo atividade referência desta enzima [155,170-173]. Em populações caucasianas, a frequência do genótipo *GSTM1-nulo* varia entre 42 e 60% [169,174]. O gene *GSTT1* apresenta igualmente um polimorfismo funcional que leva à ausência de expressão e atividade da enzima *GSTT1* (genótipo *GSTT1-nulo*) [173,175]. Encontra-se descrita uma variação entre 13 e 26% de portadores da deleção homozigótica do gene *GSTT1* para a população caucasiana [169,174].

Embora os polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* sejam considerados como fatores de suscetibilidade para cancro, pela capacidade de metabolização de carcinogénios, inúmeros estudos têm sugerido o impacto de polimorfismos em *GST* na resposta ao tratamento citotóxico e desfecho clínico dos doentes, embora, até à

data, os resultados não sejam conclusivos [154,167,176-180]. Nesta tese são também apresentados os resultados de um estudo realizado em polimorfismos no gene *CYP3A4*, que codifica um enzima envolvida no Metabolismo de Fase I, como modelo complementar comparativo aos objetivos propostos com a realização deste trabalho [181].

A escolha do CO como modelo de estudo farmacogenómico assentou no facto de ser uma neoplasia que cursa com elevada mortalidade não só pelo facto de ser diagnosticado em estádios avançados mas também pela existência de estádios precoces de mau prognóstico e pela importância da quimioterapia no tratamento desta doença, onde frequentemente se verificam respostas patológicas completas em doentes com tumores irressecáveis ao diagnóstico. O CO é considerado como um tumor quimiossensível, atingindo taxas de resposta à quimioterapia superiores a 80%, inclusivamente com taxas de resposta completas entre 40 a 60% para estádios avançados da doença. Paradoxalmente, apesar desta estratégia agressiva e a aparente eficácia do tratamento, cerca de 75% das doentes vão desenvolver recidiva da doença entre 12 e 18 meses, tornando-se candidatas para quimioterapia de segunda-linha [74,182]. Os tumores recorrentes podem ainda ser considerados como quimiossensíveis e as doentes podem ser re-submetidas a quimioterapia à base de platinos, com taxas de resposta diretamente proporcionais ao intervalo livre de tratamento, até à eventual emergência de doença resistente à terapia [183]. A elevada variabilidade no intervalo livre de progressão e a sua direta associação com a resposta aos platinos, juntamente com o facto de cerca de 20% das doentes com CO ser intrinsecamente resistente a estes compostos ao diagnóstico, levantaram a hipótese que o tratamento com quimioterapia no CO poderá estar limitado por significativas variações inter-individuais na resposta clínica [145-147,154,167,184,181,185-187].

Apesar da intensa investigação realizada no CO, a inexistência de um tratamento curativo ao diagnóstico, mesmo em tumores considerados como quimiossensíveis, continua a representar um desafio. Inúmeros esforços têm sido realizados de forma a tornar o CO curável, nomeadamente com a realização de vários ensaios clínicos com vista a aplicação de diferentes agentes citotóxicos, segundo doses e esquemas terapêuticos distintos, de forma a ultrapassar a quimioresistência observada à terapia de primeira-linha [17,108,142]. Apesar de todas as estratégias terapêuticas adotadas, as respostas clínicas permanecem reduzidas e apenas traduziram uma melhoria marginal na taxa de sobrevivência para estas doentes. Por isso, a seleção de terapias individualizadas para doentes com CO de acordo com o seu perfil genético poderá ser uma abordagem promissora. Num futuro próximo, o

desejado será alterar o paradigma do tratamento do CO com vista à adoção de opções individualizadas, passando de uma estratégia específica do órgão para uma estratégia dirigida ao alvo.

### **1.3. Objetivos**

Este estudo teve como objetivo principal avaliar os polimorfismos genéticos das Glutathionas S-Transferases como fatores de prognóstico e preditivos na resposta à quimioterapia em doentes com carcinoma epitelial do ovário.

#### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar o padrão de apresentação clínico das doentes com carcinoma epitelial do ovário admitidas no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto), entre 1996 e 2012;
2. Avaliar indicadores clínicos nas doentes com carcinoma epitelial do ovário;
3. Determinar a importância dos polimorfismos genéticos associados ao metabolismo na otimização da terapêutica, bem como na previsão de diferentes respostas clínicas;

#### 1.4. Referências Bibliográficas

1. Stewart BW, Wild CP, editors (2014) World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136 (5):E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
3. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D (2012) Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 13 (8):790-801. doi:10.1016/S1470-2045(12)70211-5
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65 (2):87-108. doi:10.3322/caac.21262
5. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013) Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 132 (5):1133-1145. doi:10.1002/ijc.27711
6. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49 (6):1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
7. INE (2015) Causas de Morte 2013. Edição 2015 edn.,
8. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1):57-70
9. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
10. Evans WE, McLeod HL (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 348 (6):538-549. doi:10.1056/NEJMra020526
11. Loktionov A (2004) Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett* 208 (1):1-33. doi:10.1016/j.canlet.2004.02.009
12. Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234 (2):177-186
13. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL et al. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409 (6822):928-933. doi:10.1038/35057149
14. Sadee W, Dai Z (2005) Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R207-214. doi:10.1093/hmg/ddi261
15. Huang RS, Ratain MJ (2009) Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin* 59 (1):42-55. doi:10.3322/caac.20002
16. Gurwitz D, Pirmohamed M (2010) Pharmacogenomics: the importance of accurate phenotypes. *Pharmacogenomics* 11 (4):469-470. doi:10.2217/pgs.10.41
17. Yan L, Beckman R (2005) Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development. *Biotechniques* 39 (10 Suppl):S565-568. doi:10.2144/000112043



18. Ingelman-Sundberg M (2001) Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 250 (3):186-200
19. Spitz MR, Wu X, Mills G (2005) Integrative epidemiology: from risk assessment to outcome prediction. *J Clin Oncol* 23 (2):267-275. doi:10.1200/JCO.2005.05.122
20. Evans WE, Relling MV (2004) Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429 (6990):464-468. doi:10.1038/nature02626
21. Efferth T, Volm M (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 107 (2):155-176. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.02.005
22. Roses AD (2004) Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nat Rev Genet* 5 (9):645-656. doi:10.1038/nrg1432
23. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors (2014) WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, vol 6. WHO Classification of Tumours, 4th edn. World Health Organization, Lyon
24. RORENO (2015) Registo Oncológico Regional do Norte 2010. Instituto Português de Oncologia do Porto, Porto
25. Rosen DG, Yang G, Liu G, Mercado-Uribe I, Chang B, Xiao XS, Zheng J, Xue FX, Liu J (2009) Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:2089-2102
26. Schuler S, Ponnath M, Engel J, Ortman O (2013) Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet* 287 (6):1187-1204. doi:10.1007/s00404-013-2784-1
27. Gubbels JA, Claussen N, Kapur AK, Connor JP, Patankar MS (2010) The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* 3:8. doi:10.1186/1757-2215-3-8
28. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C (2013) Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 Suppl 6:vi24-32. doi:10.1093/annonc/mdt333
29. Temkin SM, Minassian L, Kohn EC (2015) Early diagnosis. In: Poveda A (ed) 100 Key Questions on Ovarian Cancer. 2 edn. Permanyer,
30. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22 (2):255-288. doi:10.1210/edrv.22.2.0422
31. Murdoch WJ, McDonnell AC (2002) Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* 123 (6):743-750
32. Kurman RJ, Shih Ie M (2008) Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 27 (2):151-160. doi:10.1097/PGP.0b013e318161e4f5

33. Assis J, Pereira D, Medeiros R (2013) Ovarian cancer and DNA repair: DNA ligase IV as a potential key. *World J Clin Oncol* 4 (1):14-24. doi:10.5306/wjco.v4.i1.14
34. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN (2003) Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 97 (10 Suppl):2631-2642. doi:10.1002/cncr.11345
35. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M (2009) Ovarian cancer. *Lancet* 374 (9698):1371-1382. doi:10.1016/S0140-6736(09)61338-6
36. Levanon K, Crum C, Drapkin R (2008) New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol* 26 (32):5284-5293. doi:10.1200/JCO.2008.18.1107
37. Smith ER, Xu XX (2008) Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the aetiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion. *Lancet Oncol* 9 (11):1108-1111. doi:10.1016/S1470-2045(08)70281-X
38. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJ, Menko FH, Gille JJ, Jongasma AP, Pals G, Kenemans P, Verheijen RH (2001) Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* 195 (4):451-456. doi:10.1002/path.1000
39. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, Garber J, Birch C, Mou H, Gordon RW, Cramer DW, McKeon FD, Crum CP (2007) A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol* 211 (1):26-35. doi:10.1002/path.2091
40. Levanon K, Ng V, Piao HY, Zhang Y, Chang MC, Roh MH, Kindelberger DW, Hirsch MS, Crum CP, Marto JA, Drapkin R (2010) Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene* 29 (8):1103-1113. doi:10.1038/onc.2009.402
41. Mutch D, Denny L, Quinn M (2014) Hereditary gynecologic cancers. *Int J Gynaecol Obstet* 124 (3):189-192. doi:10.1016/j.ijgo.2013.12.001
42. Shih Ie M, Kurman RJ (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 164 (5):1511-1518
43. Fathalla MF (1971) Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2 (7716):163
44. Stadel BV (1975) Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 123 (7):772-774
45. Risch HA (1998) Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 90 (23):1774-1786
46. Merritt MA, Green AC, Nagle CM, Webb PM (2008) Talcum powder, chronic pelvic inflammation and NSAIDs in relation to risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 122 (1):170-176. doi:10.1002/ijc.23017
47. Jelovac D, Armstrong DK (2011) Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin* 61 (3):183-203. doi:10.3322/caac.20113
48. Bast RC, Jr., Hennessy B, Mills GB (2009) The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 9 (6):415-428. doi:10.1038/nrc2644

49. Folkins AK, Longacre TA (2013) Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. *Histopathology* 62 (1):2-30. doi:10.1111/his.12028
50. Romero I, López-Guerrero JA, Poveda A (2015) Molecular genetics in epithelial ovarian cancer. In: Poveda A (ed) *100 Key Questions on Ovarian Cancer*. 2 edn. Permanyer,
51. Witkowski L, Carrot-Zhang J, Albrecht S, Fahiminiya S, Hamel N, Tomiak E, Grynspan D, Saloustros E, Nadaf J, Rivera B et al. (2014) Germline and somatic SMARCA4 mutations characterize small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. *Nat Genet* 46 (5):438-443. doi:10.1038/ng.2931
52. Malander S, Rambech E, Kristoffersson U, Halvarsson B, Ridderheim M, Borg A, Nilbert M (2006) The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 101 (2):238-243. doi:10.1016/j.ygyno.2005.10.029
53. Barnes DR, Antoniou AC (2012) Unravelling modifiers of breast and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: update on genetic modifiers. *J Intern Med* 271 (4):331-343. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02502.x
54. Fleming GF, Seidman J, Lengyel E (2013) Epithelial ovarian cancer. In: Barakat R, Berchuck A, Markman M (eds) *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, pp 757-847
55. Morch LS, Lokkegaard E, Andreasen AH, Kruger-Kjaer S, Lidegaard O (2009) Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA* 302 (3):298-305. doi:10.1001/jama.2009.1052
56. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA (2014) Ovarian cancer. *Lancet* 384 (9951):1376-1388. doi:10.1016/S0140-6736(13)62146-7
57. Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM (2007) Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 43 (4):690-709. doi:10.1016/j.ejca.2006.11.010
58. Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G (2008) Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 371 (9609):303-314. doi:10.1016/S0140-6736(08)60167-1
59. Fleming JS, Beaugie CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL (2006) Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol* 247 (1-2):4-21. doi:10.1016/j.mce.2005.09.014
60. Baandrup L, Faber MT, Christensen J, Jensen A, Andersen KK, Friis S, Kjaer SK (2013) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 92 (3):245-255. doi:10.1111/aogs.12069
61. Rizzuto I, Behrens RF, Smith LA (2013) Risk of ovarian cancer in women treated with ovarian stimulating drugs for infertility. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD008215. doi:10.1002/14651858.CD008215.pub2

62. Farley J, Ozburn LL, Birrer MJ (2008) Genomic analysis of epithelial ovarian cancer. *Cell Res* 18 (5):538-548. doi:10.1038/cr.2008.52
63. Badgwell D, Bast RC, Jr. (2007) Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers* 23 (5-6):397-410
64. Halkia E, Spiliotis J, Sugarbaker P (2012) Diagnosis and management of peritoneal metastases from ovarian cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2012:541842. doi:10.1155/2012/541842
65. Forstner R, Sala E, Kinkel K, Spencer JA (2010) ESUR guidelines: ovarian cancer staging and follow-up. *Eur Radiol* 20 (12):2773-2780. doi:10.1007/s00330-010-1886-4
66. Deffieux X, Castaigne D, Pomel C (2006) Role of laparoscopy to evaluate candidates for complete cytoreduction in advanced stages of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 1:35-40. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00323.x
67. Berek JS, Bast RC (2003) Ovarian Cancer. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al. (eds) *Holland-Fei Cancer Medicine* 6th edn. BC Decker,
68. Cannistra SA (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 351 (24):2519-2529. doi:10.1056/NEJMra041842
69. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59 (4):225-249. doi:10.3322/caac.20006
70. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R (2014) Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 15 (1):23-34. doi:10.1016/S1470-2045(13)70546-1
71. Menon U, Griffin M, Gentry-Maharaj A (2014) Ovarian cancer screening--current status, future directions. *Gynecol Oncol* 132 (2):490-495. doi:10.1016/j.ygyno.2013.11.030
72. Chan JK, Cheung MK, Husain A, Teng NN, West D, Whittemore AS, Berek JS, Osann K (2006) Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years. *Obstet Gynecol* 108 (3 Pt 1):521-528. doi:10.1097/01.AOG.0000231680.58221.a7
73. Prat J (2012) New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol* 23 Suppl 10:x111-117. doi:10.1093/annonc/mds300
74. Romero I, Bast RC, Jr. (2012) Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* 153 (4):1593-1602. doi:10.1210/en.2011-2123
75. Prat J (2014) Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 124 (1):1-5. doi:10.1016/j.ijgo.2013.10.001
76. Coffrey DM, Ramzy I (2012) Ovary and Fallopian Tube. In: *Frozen Section Library: Gynecologic Pathology Intraoperative Consultation*. Frozen Section Library, vol 11. Springer Science+Business Media, LLC, pp 153-228. doi:10.1007/978-0-387-95958-0\_6

77. Kaspar HG, Crum CP (2015) The utility of immunohistochemistry in the differential diagnosis of gynecologic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 139 (1):39-54. doi:10.5858/arpa.2014-0057-RA
78. Lengyel E (2010) Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 177 (3):1053-1064. doi:10.2353/ajpath.2010.100105
79. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ (2002) Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 20 (5):1248-1259
80. Vergote I, Trope CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, Verheijen RH, van der Burg ME, Lacave AJ, Panici PB, Kenter GG, Casado A, Mendiola C, Coens C, Verleye L, Stuart GC, Pecorelli S, Reed NS (2010) Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIc or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 363 (10):943-953. doi:10.1056/NEJMoa0908806
81. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J (2009) Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 115 (6):1234-1244. doi:10.1002/cncr.24149
82. van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, Kobienska A, Colombo N, Favalli G, Lacave AJ, Nardi M, Renard J, Pecorelli S (1995) The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med* 332 (10):629-634. doi:10.1056/NEJM199503093321002
83. Poveda A, Romero I (2016) Advanced ovarian cancer: 20 years of ovarian cancer treatment. *Ann Oncol* 27 Suppl 1:i72-i73. doi:10.1093/annonc/mdw081
84. McLachlan J, Gore M (2015) Prognostic factors in epithelial ovarian cancer. In: Poveda A (ed) 100 Key Questions on Ovarian Cancer. 2 edn. Permanyer,
85. Mackay HJ, Brady MF, Oza AM, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Swart AM, Siddiqui N, Colombo N, Bookman MA, Pfisterer J, du Bois A (2010) Prognostic relevance of uncommon ovarian histology in women with stage III/IV epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 20 (6):945-952. doi:10.1111/IGC.0b013e3181dd0110
86. Matias-Guiu X, Davidson B (2014) Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 464 (3):315-331. doi:10.1007/s00428-013-1509-y
87. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma (2011). *Nature* 474 (7353):609-615. doi:10.1038/nature10166
88. Verhaak RG, Tamayo P, Yang JY, Hubbard D, Zhang H, Creighton CJ, Feraday S, Lawrence M, Carter SL, Mermel CH et al. (2013) Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 123 (1):517-525. doi:10.1172/JCI65833

89. Swart AC, on behalf of ICON Collaborators (2007) Long-term follow-up of women enrolled in a randomized trial of adjuvant chemotherapy for early stage ovarian cancer (ICON1).
90. Colombo N, Guthrie D, Chiari S, Parmar M, Qian W, Swart AM, Torri V, Williams C, Lissoni A, Bonazzi C (2003) International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 95 (2):125-132
91. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S (2003) 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. *J Natl Cancer Inst* 95 (2):113-125
92. Minig L, Pereira D (2015) Treatment of early stage ovarian cancer. In: Poveda A (ed) 100 Key Questions on Ovarian Cancer. 2 edn. Permanyer,
93. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M (1996) Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 334 (1):1-6. doi:10.1056/NEJM199601043340101
94. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, Stuart G, Kaye S, Vergote I, Blom R et al. (2000) Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 92 (9):699-708
95. Pignata S, Cecere SC, Pujade-Lauraine E (2015) Treatment of advanced disease. In: Poveda A (ed) 100 Key Questions on Ovarian Cancer. 2 edn. Permanyer,
96. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, DeGeest K, Hartenbach EM, Baergen R (2003) Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 21 (17):3194-3200. doi:10.1200/JCO.2003.02.153
97. Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, Gabra H, Coleman R, Atkinson R, Parkin D, Paul J, Hay A, Kaye SB (2004) Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96 (22):1682-1691. doi:10.1093/jnci/djh323
98. Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, Sorensen PG, Hansen M, Sessa C, de Swart CA, Hirsch FR, Lund B, van Houwelingen HC (2000) Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 18 (17):3084-3092
99. Bookman MA, Brady MF, McGuire WP, Harper PG, Alberts DS, Friedlander M, Colombo N, Fowler JM, Argenta PA, De Geest K, Mutch DG, Burger RA, Swart AM, Trimble EL, Accario-Winslow C, Roth LM (2009) Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-

- stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *J Clin Oncol* 27 (9):1419-1425. doi:10.1200/JCO.2008.19.1684
100. Pignata S, Scambia G, Ferrandina G, Savarese A, Sorio R, Breda E, Gebbia V, Musso P, Frigerio L, Del Medico P et al. (2011) Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: the MITO-2 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 29 (27):3628-3635. doi:10.1200/JCO.2010.33.8566
101. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX (2011) Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 365 (26):2473-2483. doi:10.1056/NEJMoa1104390
102. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C et al. (2011) A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 365 (26):2484-2496. doi:10.1056/NEJMoa1103799
103. van der Burg ME, Onstenk W, Boere IA, Look M, Ottevanger PB, de Gooyer D, Kerkhofs LG, Valster FA, Ruit JB, van Reisen AG, Goey SH, van der Torren AM, ten Bokkel Huinink D, Kok TC, Verweij J, van Doorn HC (2014) Long-term results of a randomised phase III trial of weekly versus three-weekly paclitaxel/platinum induction therapy followed by standard or extended three-weekly paclitaxel/platinum in European patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 50 (15):2592-2601. doi:10.1016/j.ejca.2014.07.015
104. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA (2006) Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 354 (1):34-43. doi:10.1056/NEJMoa052985
105. Hess LM, Benham-Hutchins M, Herzog TJ, Hsu CH, Malone DC, Skrepnek GH, Slack MK, Alberts DS (2007) A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 17 (3):561-570. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00846.x
106. Chiva LM, Gonzalez-Martin A (2015) A critical appraisal of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in the treatment of advanced and recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 136 (1):130-135. doi:10.1016/j.ygyno.2014.11.072
107. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Kristensen G, Jakobsen A, Sagae S, Greven K, Parmar M, Friedlander M, Cervantes A, Vermorken J (2011) Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg). *Int J Gynecol Cancer* 21 (2):419-423. doi:10.1097/IGC.0b013e3182070f17
108. Agarwal R, Kaye SB (2003) Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3 (7):502-516. doi:10.1038/nrc1123

109. Sandercock J, Parmar MK, Torri V, Qian W (2002) First-line treatment for advanced ovarian cancer: paclitaxel, platinum and the evidence. *Br J Cancer* 87 (8):815-824. doi:10.1038/sj.bjc.6600567
110. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M (2001) Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51 (1):15-36
111. Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M, Harter P, Pignata S, Pujade-Lauraine E, Sehouli J et al. (2011) Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 21 (4):771-775. doi:10.1097/IGC.0b013e31821bb8aa
112. Gonzalez-Martin AJ, Calvo E, Bover I, Rubio MJ, Arcusa A, Casado A, Ojeda B, Balana C, Martinez E, Herrero A, Pardo B, Adrover E, Rifa J, Godes MJ, Moyano A, Cervantes A (2005) Randomized phase II trial of carboplatin versus paclitaxel and carboplatin in platinum-sensitive recurrent advanced ovarian carcinoma: a GEICO (Grupo Espanol de Investigacion en Cancer de Ovario) study. *Ann Oncol* 16 (5):749-755. doi:10.1093/annonc/mdi147
113. Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, Floriani I, Jayson G, Lamont A, Trope C (2003) Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 361 (9375):2099-2106
114. Pfisterer J, Plante M, Vergote I, du Bois A, Hirte H, Lacave AJ, Wagner U, Stahle A, Stuart G, Kimmig R, Olbricht S, Le T, Emerich J, Kuhn W, Bentley J, Jackisch C, Luck HJ, Rochon J, Zimmermann AH, Eisenhauer E (2006) 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. *J Clin Oncol* 24 (29):4699-4707. doi:10.1200/JCO.2006.06.0913
115. Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E, Gebiski V, Heywood M, Vasey PA, Volgger B, Vergote I, Pignata S, Ferrero A, Sehouli J, Lortholary A, Kristensen G, Jackisch C, Joly F, Brown C, Le Fur N, du Bois A (2010) Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol* 28 (20):3323-3329. doi:10.1200/JCO.2009.25.7519
116. Bast RC, Jr., Markman M (2010) Chemotherapy: A new standard combination for recurrent ovarian cancer? *Nat Rev Clin Oncol* 7 (10):559-560. doi:10.1038/nrclinonc.2010.152
117. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR (2012) OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol* 30 (17):2039-2045. doi:10.1200/JCO.2012.42.0505
118. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, Pujade-Lauraine E, Lisyanskaya AS, Makhson AN, Rolski J, Gorbounova VA, Ghatage P, Bidzinski M, Shen K, Ngan HY, Vergote IB, Nam JH, Park YC, Lebedinsky CA, Poveda AM (2010) Trabectedin plus pegylated



- liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 28 (19):3107-3114. doi:10.1200/JCO.2009.25.4037
119. Fung-Kee-Fung M, Oliver T, Elit L, Oza A, Hirte HW, Bryson P (2007) Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. *Curr Oncol* 14 (5):195-208
120. Gordon AN, Tonda M, Sun S, Rackoff W (2004) Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 95 (1):1-8. doi:10.1016/j.ygyno.2004.07.011
121. Markman M, Blessing J, Rubin SC, Connor J, Hanjani P, Waggoner S (2006) Phase II trial of weekly paclitaxel (80 mg/m<sup>2</sup>) in platinum and paclitaxel-resistant ovarian and primary peritoneal cancers: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 101 (3):436-440. doi:10.1016/j.ygyno.2005.10.036
122. ten Bokkel Huinink W, Gore M, Carmichael J, Gordon A, Malfetano J, Hudson I, Broom C, Scarabelli C, Davidson N, Spanczynski M, Bolis G, Malmstrom H, Coleman R, Fields SC, Heron JF (1997) Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 15 (6):2183-2193
123. Friedlander M, Millward MJ, Bell D, Bugat R, Harnett P, Moreno JA, Campbell L, Varette C, Ripoche V, Kayitalire L (1998) A phase II study of gemcitabine in platinum pre-treated patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Ann Oncol* 9 (12):1343-1345
124. Burger RA, Sill MW, Monk BJ, Greer BE, Sorosky JI (2007) Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 25 (33):5165-5171. doi:10.1200/JCO.2007.11.5345
125. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, Hambleton J, Dupont J, Mackey H, Douglas J, Burger RA, Armstrong D, Wenham R, McGuire W (2007) Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 25 (33):5180-5186. doi:10.1200/JCO.2007.12.0782
126. Berkenblit A, Seiden MV, Matulonis UA, Penson RT, Krasner CN, Roche M, Mezzetti L, Atkinson T, Cannistra SA (2004) A phase II trial of weekly docetaxel in patients with platinum-resistant epithelial ovarian, primary peritoneal serous cancer, or fallopian tube cancer. *Gynecol Oncol* 95 (3):624-631. doi:10.1016/j.ygyno.2004.08.028
127. Rose PG, Blessing JA, Mayer AR, Homesley HD (1998) Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16 (2):405-410
128. Ray-Coquard I, Oaknin A, Linossi C, Kandalaft LE (2015) New targeted therapies and development. In: Poveda A (ed) *100 Key Questions on Ovarian Cancer*. 2 edn. Permanyer,
129. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, Sorio R, Vergote I, Witteveen P, Bamias A, Pereira D, Wimberger P, Oaknin A, Mirza MR, Follana P, Bollag D, Ray-Coquard I (2014) Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent

- ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32 (13):1302-1308. doi:10.1200/JCO.2013.51.4489
130. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, Dougherty B, Orr M, Hodgson D, Barrett JC, Matulonis U (2014) Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15 (8):852-861. doi:10.1016/S1470-2045(14)70228-1
131. Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, Kaye SB (2010) Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 28 (15):2512-2519. doi:10.1200/JCO.2009.26.9589
132. National Comprehensive Cancer Network. Ovarian cancer including Fallopian Tube Cancer and Primary Peritoneal Cancer (Version 2.2015). [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/ovarian.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf). Accessed September 11, 2015
133. Ledermann JA (2016) PARP inhibitors in ovarian cancer. *Ann Oncol* 27 Suppl 1:i40-i44. doi:10.1093/annonc/mdw094
134. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434 (7035):917-921. doi:10.1038/nature03445
135. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8 (3):193-204. doi:10.1038/nrc2342
136. Drew Y, Ledermann J, Hall G, Rea D, Glasspool R, Highley M, Jayson G, Sludden J, Murray J, Jamieson D, Halford S, Acton G, Backholer Z, Mangano R, Boddy A, Curtin N, Plummer R (2016) Phase 2 multicentre trial investigating intermittent and continuous dosing schedules of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib in germline BRCA mutation carriers with advanced ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 114 (12):e21. doi:10.1038/bjc.2016.133
137. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, Fabbro M, Ledermann JA, Lorusso D, Vergote I et al. (2016) Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. doi:10.1056/NEJMoa1611310
138. Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermarck U, Jasin M, Pierce AJ, Bristow RG, Classon MK, Glazer PM (2005) Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res* 65 (24):11597-11604. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2119
139. Chan N, Pires IM, Bencokova Z, Coackley C, Luoto KR, Bhogal N, Lakshman M, Gottipati P, Oliver FJ, Helleday T, Hammond EM, Bristow RG (2010) Contextual synthetic lethality of

cancer cell kill based on the tumor microenvironment. *Cancer Res* 70 (20):8045-8054. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2352

140. Liu JF, Tolaney SM, Birrer M, Fleming GF, Buss MK, Dahlberg SE, Lee H, Whalen C, Tyburski K, Winer E, Ivy P, Matulonis UA (2013) A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer. *Eur J Cancer* 49 (14):2972-2978. doi:10.1016/j.ejca.2013.05.020

141. Liu JF, Barry WT, Birrer M, Lee JM, Buckanovich RJ, Fleming GF, Rimel B, Buss MK, Nattam S, Hurteau J, Luo W, Quy P, Whalen C, Obermayer L, Lee H, Winer EP, Kohn EC, Ivy SP, Matulonis UA (2014) Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 15 (11):1207-1214. doi:10.1016/S1470-2045(14)70391-2

142. Colombo PE, Fabbro M, Theillet C, Bibeau F, Rouanet P, Ray-Coquard I (2014) Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 89 (2):207-216. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.08.017

143. Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, Ang JE, Gourley C, Karlan BY, Amnon A, Bell-McGuinn KM, Chen LM, Friedlander M, Safra T, Vergote I, Wickens M, Lowe ES, Carmichael J, Kaufman B (2012) Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 30 (4):372-379. doi:10.1200/JCO.2011.36.9215

144. Monk BJ, Ghatage P, Parekh T, Henitz E, Knoblauch R, Matos-Pita AS, Nieto A, Park YC, Cheng PS, Li W, Favis R, Ricci D, Poveda A (2015) Effect of BRCA1 and XPG mutations on treatment response to trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced ovarian cancer: exploratory analysis of the phase 3 OVA-301 study. *Ann Oncol* 26 (5):914-920. doi:10.1093/annonc/mdv071

145. Caiola E, Brogginini M, Marabese M (2014) Genetic markers for prediction of treatment outcomes in ovarian cancer. *Pharmacogenomics J* 14 (5):401-410. doi:10.1038/tpj.2014.32

146. Lambrechts S, Lambrechts D, Despierre E, Van Nieuwenhuysen E, Smeets D, Debruyne PR, Renard V, Vroman P, Luyten D, Neven P, Amant F, Leunen K, Vergote I (2015) Genetic variability in drug transport, metabolism or DNA repair affecting toxicity of chemotherapy in ovarian cancer. *BMC Pharmacol Toxicol* 16:2. doi:10.1186/s40360-015-0001-5

147. Paige AJ, Brown R (2008) Pharmaco(epi)genomics in ovarian cancer. *Pharmacogenomics* 9 (12):1825-1834. doi:10.2217/14622416.9.12.1825

148. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, Yu F, Bonnen PE, de Bakker PI, Deloukas P, Gabriel SB et al. (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467 (7311):52-58. doi:10.1038/nature09298

149. Monzo M, Navarro A, Ferrer G, Artells R (2008) Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clin Transl Oncol* 10 (10):628-637

150. Baye TM, Wilke RA (2010) Mapping genes that predict treatment outcome in admixed populations. *Pharmacogenomics J* 10 (6):465-477. doi:10.1038/tpj.2010.71
151. Bozina N, Bradamante V, Lovric M (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* 60 (2):217-242. doi:10.2478/10004-1254-60-2009-1885
152. Klaassen CD (2008) *The Basic Science of Poisons. Casarett & Doull's Toxicology, 7th edition edn.* McGraw-Hill,
153. Weinshilboum R (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 348 (6):529-537. doi:10.1056/NEJMra020021
154. Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B, Yu H (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol* 100 (2):330-337. doi:10.1016/j.ygyno.2005.08.035
155. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
156. Rodrigues IS, Kuasne H, Losi-Guembarovski R, Fuganti PE, Gregorio EP, Kishima MO, Ito K, de Freitas Rodrigues MA, de Syllos Colus IM (2011) Evaluation of the influence of polymorphic variants CYP1A1 2B, CYP1B1 2, CYP3A4 1B, GSTM1 0, and GSTT1 0 in prostate cancer. *Urol Oncol* 29 (6):654-663. doi:10.1016/j.urolonc.2010.01.009
157. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482 (1-2):21-26
158. Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22 (47):7265-7279. doi:10.1038/sj.onc.1206933
159. Hildebrandt MA, Gu J, Wu X (2009) Pharmacogenomics of platinum-based chemotherapy in NSCLC. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5 (7):745-755. doi:10.1517/17425250902973711
160. Penzvalto Z, Surowiak P, Gyorffy B (2014) Biomarkers for systemic therapy in ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 14 (3):259-273
161. Coley HM (2008) Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 34 (4):378-390. doi:10.1016/j.ctrv.2008.01.007
162. Rabik CA, Dolan ME (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33 (1):9-23. doi:10.1016/j.ctrv.2006.09.006
163. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (7):3070-3074
164. Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10 (1):2-18. doi:10.1021/tx960072x
165. Gonlugur U, Pinarbasi H, Gonlugur TE, Silig Y (2006) The association between polymorphisms in glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and lung cancer outcome. *Cancer Invest* 24 (5):497-501. doi:10.1080/07357900600814813

166. Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, Fares MY, Stone A, Kadlubar FF, Hutchins LF (2001) Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res* 61 (19):7130-7135
167. Medeiros R, Pereira D, Afonso N, Palmeira C, Faleiro C, Afonso-Lopes C, Freitas-Silva M, Vasconcelos A, Costa S, Osorio T, Lopes C (2003) Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int J Clin Oncol* 8 (3):156-161. doi:10.1007/s10147-003-0318-8
168. Paugh SW, Stocco G, McCorkle JR, Diouf B, Crews KR, Evans WE (2011) Cancer pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther* 90 (3):461-466. doi:10.1038/clpt.2011.126
169. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P et al. (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (12):1239-1248
170. Seidegard J, Pero RW (1988) The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11:125-126
171. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (19):7293-7297
172. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR (1998) Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 273 (6):3517-3527
173. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW (1996) A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 107 (2):229-233
174. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE (2006) Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 57:119-137. doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104724
175. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 ( Pt 1):271-276
176. Nagle CM, Chenevix-Trench G, Spurdle AB, Webb PM (2007) The role of glutathione-S-transferase polymorphisms in ovarian cancer survival. *Eur J Cancer* 43 (2):283-290. doi:10.1016/j.ejca.2006.09.011
177. Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, Leite JL, Granja F, Ward LS (2006) Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 132 (8):521-528. doi:10.1007/s00432-006-0099-3
178. Kim HS, Kim MK, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB (2009) Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study. *Gynecol Oncol* 113 (2):264-269. doi:10.1016/j.ygyno.2009.01.002

179. Khrunin A, Ivanova F, Moisseev A, Khokhrin D, Sleptsova Y, Gorbunova V, Limborska S (2012) Pharmacogenomics of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients of different ethnic origins. *Pharmacogenomics* 13 (2):171-178. doi:10.2217/pgs.11.140
180. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S (2010) Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J* 10 (1):54-61. doi:10.1038/tpj.2009.45
181. Assis J, Pereira D, Gomes M, Marques D, Marques I, Nogueira A, Catarino R, Medeiros R (2013) Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile. *Int J Clin Exp Med* 6 (7):552-561
182. Bhoola S, Hoskins WJ (2006) Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 107 (6):1399-1410. doi:10.1097/01.AOG.0000220516.34053.48
183. Bookman MA (2003) Developmental chemotherapy and management of recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21 (10 Suppl):149s-167s
184. Diaz-Padilla I, Amir E, Marsh S, Liu G, Mackay H (2012) Genetic polymorphisms as predictive and prognostic biomarkers in gynecological cancers: a systematic review. *Gynecol Oncol* 124 (2):354-365. doi:10.1016/j.ygyno.2011.10.034
185. Pinto D, Pereira D, Portela C, da Silva JL, Lopes C, Medeiros R (2005) The influence of HER2 genotypes as molecular markers in ovarian cancer outcome. *Biochem Biophys Res Commun* 335 (4):1173-1178. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.012
186. Santos AM, Sousa H, Portela C, Pereira D, Pinto D, Catarino R, Rodrigues C, Araujo AP, Lopes C, Medeiros R (2006) TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 340 (1):256-262. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.176
187. Bergmann TK, Green H, Brasch-Andersen C, Mirza MR, Herrstedt J, Holund B, du Bois A, Damkier P, Vach W, Brosen K, Peterson C (2011) Retrospective study of the impact of pharmacogenetic variants on paclitaxel toxicity and survival in patients with ovarian cancer. *Eur J Clin Pharmacol* 67 (7):693-700. doi:10.1007/s00228-011-1007-6

## **CAPÍTULO II**





## **2.1. Apresentação clínica das doentes com carcinoma epitelial do ovário**

### **2.1.1. População**

Foi analisada de forma retrospectiva uma série consecutiva de doentes com cancro epitelial do ovário, diagnosticadas entre janeiro de 1996 e dezembro de 2012, que foram tratadas e seguidas no IPO-Porto. A listagem das doentes foi obtida junto do RORENO. Foram excluídas as doentes que recorreram ao instituto para obter uma segunda opinião em relação ao seu tratamento oncológico ou para realizarem apenas técnicas específicas de tratamento (ex. HIPEC) e que depois continuaram o seu seguimento noutras instituições de saúde.

Utilizando um formulário estandardizado, foi registada a informação relativamente a fatores socio-demográficos, fatores de risco, características do tumor, tratamentos efetuados e a sua efetividade e sobrevivência. O sistema de estadiamento utilizado foi o de FIGO de 2006 [1].

### **2.1.2. Avaliação da População**

O objetivo primário da análise foi a sobrevivência global. A sobrevivência global foi definida desde a data de diagnóstico até à data de morte por cancro (morte específica por cancro) ou até 31 de outubro de 2016 (data de censura). A resposta ao tratamento e a sobrevivência livre de doença foram considerados objetivos exploratórios. Não foi realizada uma avaliação formal de resposta de forma prospetiva e, por isso, esta avaliação foi feita pelo médico assistente recorrendo à avaliação imagiológica ou pela cinética do CA125, utilizando os critérios de Rustin [2]. A sobrevivência livre de doença foi definida desde a data de diagnóstico até à data da primeira recidiva, nas doentes que obtiveram resposta completa à abordagem terapêutica inicial.

### **2.1.3. Ética**

O estudo foi submetido à Comissão de Ética da Instituição, tendo sido aprovado. Dado o carácter retrospectivo da análise e a inclusão de um período

temporal extenso, foi pedida a dispensa de necessidade de consentimento informado na população total do estudo.

#### **2.1.4. Análise Estatística**

As características das doentes ao diagnóstico foram analisadas utilizando métodos descritivos. O tempo de seguimento foi calculado utilizando tabelas de sobrevivência. A probabilidade de sobrevivência foi demonstrada e analisada utilizando curvas de *Kaplan-Meier* e as respetivas tabelas de sobrevivência. O impacto prognóstico de algumas variáveis clínico-patológicas foi estudado a partir de um modelo de regressão de Cox.

Todos os testes estatísticos eram *two-sided* e a significância foi definida como  $P < 0.05$ . A análise estatística foi realizada com o *Statistical Package for the Social Sciences* versão 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

#### **2.1.5. Resultados**

##### **Características da População**

Entre janeiro de 1996 e dezembro de 2012 foram admitidas 1039 doentes com carcinoma epitelial do ovário. A idade média ao diagnóstico foi de 58,3 anos  $\pm$  13,9 anos (mediana de 59 anos), das quais 64,5% eram pós-menopáusicas. A idade média da menarca foi de 13,3 anos (mediana de 13 anos) e a idade média de menopausa 48,4 anos (mediana de 50 anos).

Ao diagnóstico, 21,9% das doentes eram nulíparas. Relativamente à terapêutica hormonal de substituição, esta foi administrada em 7,4%, e a utilização de contraceptivos orais foi verificada em 25,5% da população. A maioria das doentes (95%) não apresentava história de hábitos tabágicos. No que concerne à história familiar de cancro da mama e/ou ovário, esta foi referida em 12,2% das doentes. Em 6,8% foi também observada história pessoal de cancro da mama.

Ao diagnóstico, 60,1% das doentes apresentavam doença em estadio avançado (FIGO III/IV), 34,9% em estadio I e 5,0% em estadio II. Relativamente ao subtipo histológico, o carcinoma seroso foi o mais frequente (50,8%) (Tabela 2).

## Tratamento

A cirurgia citorrredutora completa foi efetuada em 48,7% da população enquanto que 15,6% e 22,6% das doentes apresentou doença residual < 2 cm e ≥ 2 cm, respetivamente. Em 13,1% dos casos, o tumor foi considerado irresssecável.

Foi efetuada uma estratificação para risco de recorrência em baixo risco (estadio IA/IB, G1/G2), alto risco (estadio IA/IB, G3/G4; IC; II ou células claras em qualquer estadio) e doença avançada (estadio III/IV) tendo-se verificado uma frequência de 12,3%, 23,6% e 60,1%, respetivamente. Os tumores *borderline* em estadio inicial representaram 4,0% do total (Tabela 2).

Na abordagem terapêutica, em 77,1% das doentes foi efetuada cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia. A cirurgia como terapêutica isolada foi realizada em 14% das doentes, dado não apresentarem critérios para tratamento adjuvante. Em 4% dos casos, a abordagem inicial consistiu em quimioterapia neoadjuvante.

Em 34,6% das doentes o regime de quimioterapia utilizado foi Cisplatina e Paclitaxel, em 45% Carboplatina e Paclitaxel e 5,8% das doentes foram incluídas em ensaios clínicos.

Nesta população, 45,6% das doentes desenvolveram recidiva da doença. A persistência da doença foi observada em 6,8% dos casos. Na avaliação da sensibilidade aos platinos, 10,8% foram considerados refratários, 7,7% resistentes, 6,8% parcialmente sensíveis e 60,1% sensíveis (Tabela 2).

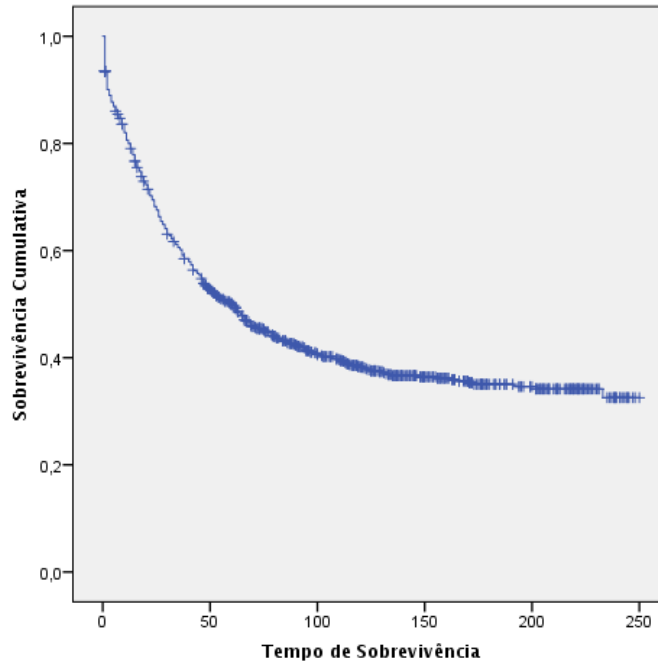
**Tabela 2.** Características clínico-patológicas das doentes com carcinoma epitelial do ovário incluídas no estudo

<b>Parâmetro Clínico-Patológico</b>	<b>%</b>
<b>Estadiamento FIGO</b>	
Estadio I	34,9%
Estadio II	5,0%
Estadio III	41,2%
Estadio IV	18,9%
<b>Subtipo Histológico</b>	
Seroso	50,8%
Endometrióide	9,1%
Células Claras	7,7%
Mucinoso	15,4%
Carcinoma	13,1%
Mistos	2,2%
Outros	1,7%
<b>Grau de Diferenciação</b>	
Bem Diferenciado (G1)	24,3%
Moderadamente Diferenciado (G2)	24,8%
Pouco Diferenciado (G3)	41,1%
Indiferenciado (G4)	3,3%
<i>Borderline</i>	6,5%
<b>Extensão da Cirurgia</b>	
Completa	48,7%
Doença Residual < 2 cm	15,6%
Doença Residual ≥ 2 cm	22,6%
Doença Irressecável	13,1%
<b>Risco de Recorrência</b>	
Baixo Risco (IA/IB, G1/G2)	12,3%
Alto Risco (IA/IB, G3/G4; IC; II; células claras)	23,6%
Doença Avançada	60,1%
<i>Borderline</i>	4,0%
<b>Abordagem Terapêutica</b>	
Cirurgia seguida de Quimioterapia	77,1%
Cirurgia	14,0%
Quimioterapia	4,3%
Quimioterapia Neoadjuvante	4,0%
Tratamento Sintomático	0,6%
<b>Quimioterapia</b>	
Cisplatina e Paclitaxel	34,6%
Carboplatina e Paclitaxel	45,0%
Ensaio Clínico	5,8%
Não Realizada	14,6%
<b>Recidiva</b>	
Sim	45,6%
Não	47,6%
Persistência/Progressão da Doença	6,8%
<b>Sensibilidade aos Platinos</b>	
Sensível	60,1%
Parcialmente Sensível	6,8%
Resistentes	7,7%
Refratários	10,8%
Não Avaliável*	14,6%

\*Doentes que não realizaram quimioterapia

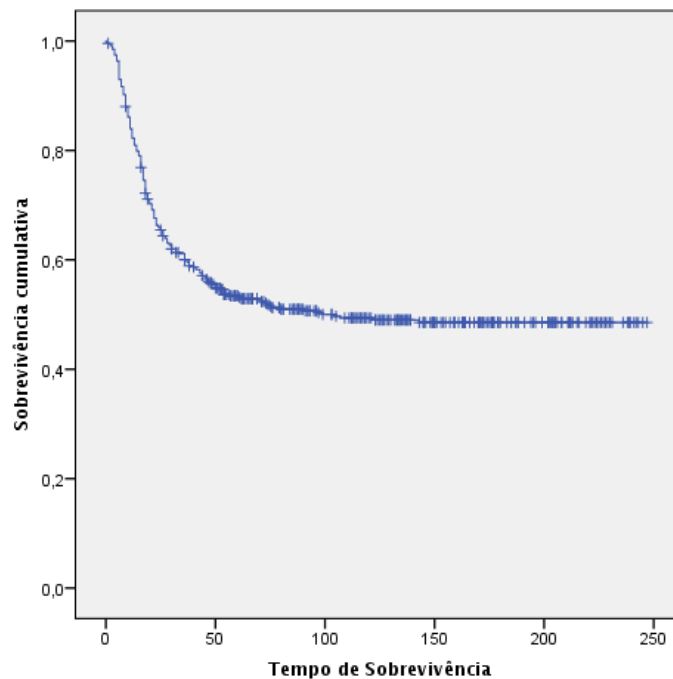
## Sobrevivência

A sobrevivência global aos 5 anos foi de 51,1%, fixando-se em 40% para o tempo total de seguimento da série, perante a análise da curva de *Kaplan-Meier* (Figura 6).



**Figura 6.** Curva de *Kaplan-Meier* para o tempo de sobrevivência global (morte específica por cancro) das doentes com carcinoma epitelial do ovário (tempo em meses).

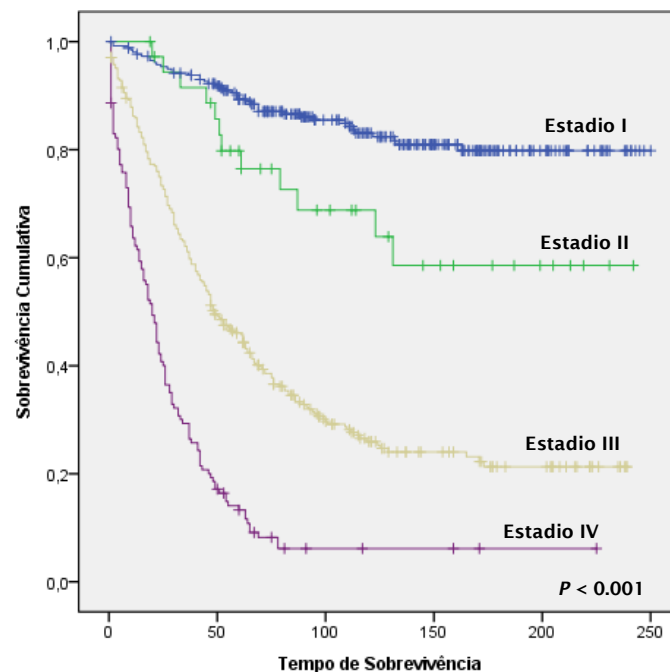
Na Figura 7, está representada a sobrevivência livre de doença, a qual foi de 53,4% aos 5 anos.



**Figura 7.** Curva de *Kaplan-Meier* para o tempo de sobrevivência livre de doença das doentes com carcinoma epitelial do ovário (tempo em meses).

## Fatores de Prognóstico

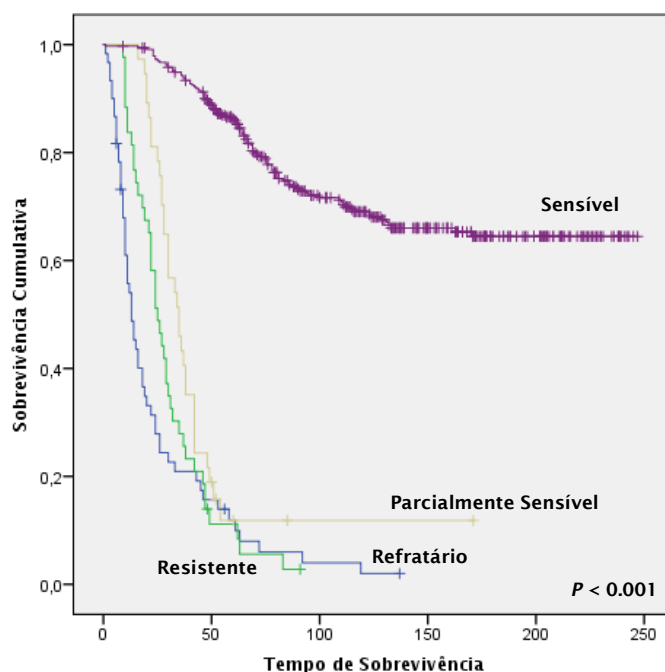
A influência do estadiamento na sobrevivência está espelhado na Figura 8. A taxa de sobrevivência a 5 anos é de 89,3% e 79,8% para estadios precoces, ou seja, estadio I e II, respetivamente. Por outro lado, estadios avançados estão associados a pior prognóstico sendo a taxa de sobrevivência a 5 anos de 46,1% para o estadio III e 13,3% para estadio IV, o que está de acordo com os dados publicados.



**Figura 8.** Curvas de *Kaplan-Meier* para o tempo de sobrevivência global (morte específica por cancro) das doentes com carcinoma epitelial do ovário, de acordo com o estadiamento FIGO (tempo em meses).

O impacto da sensibilidade aos platinos está demonstrado na Figura 9. As doentes com doença platino-sensível apresentam taxas de sobrevivência de 86,2% aos 5 anos, mantendo-se elevadas no seguimento a 10 anos (69,5 %) e 20 anos (64,5%).

Na avaliação do tempo de sobrevivência aos 2 anos, as doentes portadoras de tumores parcialmente sensíveis apresentam uma tendência para melhor prognóstico (81,1%), face ao grupo de doentes platino-resistentes (58,1%) e platino-refratárias (31,4%). No entanto, na avaliação a longo prazo, o comportamento das doentes portadoras de tumores classificados como parcialmente sensíveis é semelhante ao grupo das doentes resistentes/refratárias aos platinos (Figura 9) demonstrando a importância da necessidade de investigação para uma melhor definição desta classificação.



**Figura 9.** Curvas de *Kaplan-Meier* para o tempo de sobrevivência global (morte específica por cancro) das doentes com carcinoma epitelial do ovário, de acordo com a sensibilidade aos platinos (tempo em meses).

A importância da classificação da sensibilidade aos platinos na avaliação de risco de morte aos 5 anos foi evidenciada utilizando a metodologia de regressão logística de Cox (Tabela 3). Observamos que as doentes com cancro do ovário classificadas como não sensíveis aos platinos (parcialmente sensíveis, resistentes, refratárias) apresentavam um risco 5 vezes superior de morte numa avaliação a 5 anos (HR, 8,39; 95 % CI; 5,38-13,09;  $P < 0,001$ ) quando comparadas com o grupo de platino-sensível. Esta diferença mantém-se mesmo após ajuste aos fatores de prognóstico clássicos como subtipo histológico, estadio FIGO, grau de diferenciação e existência de doença residual pós cirurgia.

**Tabela 3.** Risco de morte a 5 anos das doentes com carcinoma epitelial do ovário, de acordo com diferentes características clínicas

	HR	95% CI	P
Sensibilidade aos Platinos (Outros vs Sensível)	8,39	5,38 - 13,09	< 0,001
Histologia (Serosos vs Outros)	1,08	0,74 - 1,58	0,677
Estadio FIGO (Estadio III/IV vs Estadio I/II)	2,51	1,24 - 5,06	0,010
Extensão Cirurgia (Outros vs Completa)	1,41	0,79 - 2,50	0,248
Grau de Diferenciação (Grau 1 vs 2 vs 3 vs 4)	1,02	0,96 - 1,08	0,596
Status Hormonal (Pré vs Pós-Menopausa)	0,98	0,89 - 1,09	0,765
Idade (> 59 anos vs ≤ 59 anos)	1,71	1,20 - 2,43	0,003

HR, Hazard Ratio; 95 % CI, Intervalo de Confiança a 95 %

### 2.1.6. Referências Bibliográficas

1. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S, Beller U (2006) Carcinoma of the ovary. FIGO 26<sup>th</sup> Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 95 (Suppl 1):S161-92. doi: 10.1016/S0020-7292(06)60033-7
2. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Kristensen G, Jakobsen A, Sagae S, Greven K, Parmar M, Friedlander M, Cervantes A, Vermorken J (2011) Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIIG). *Int J Gynecol Cancer* 21 (2):419-423. doi:10.1097/IGC.0b013e3182070f17



## **CAPÍTULO III**



### **3.1. Improvement of a predictive model in ovarian cancer patients submitted to platinum-based chemotherapy: implications of a GST activity profile**

**Deolinda Pereira**<sup>1,2\*</sup>, Joana Assis<sup>3,4\*</sup>, Mónica Gomes<sup>2,3,5</sup>, Augusto Nogueira<sup>3,4,5</sup>, Rui Medeiros<sup>2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup>Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>2</sup>ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, Porto, Portugal

<sup>3</sup>Molecular Oncology and Viral Pathology Group – Research Center, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>4</sup>FMUP, Faculty of Medicine of Porto University, Porto, Portugal

<sup>5</sup>Research Department, Portuguese League against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal

<sup>6</sup>CEBIMED, Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Poro, Portugal

\*Deolinda Pereira and Joana Assis contributed equally to this work

#### **Corresponding author:**

Prof. Doutor Rui Medeiros

Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE

Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral – CI, Edifício Laboratórios. 4º piso

Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

Telephone: +351 22 508 4000; Fax: +351 22 508 4001

Email: ruimedei@ipoporto.min-saude.pt

#### **Acknowledgements**

We would like to thank the Liga Portuguesa contra o Cancro-Centro Regional do Norte (Portuguese League against Cancer), Ministério da Saúde de Portugal (CFICS-45/2007), IPO-Porto (CI-IPOP-22-2015) and FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia). Joana Assis is a doctoral degree Grant holder from FCT (SFRH/BD/98536/2013).

## Abstract

**Purpose** The success of chemotherapy in ovarian cancer (OC) is directly associated with the broad variability in platinum response, with implications in patients survival. This heterogeneous response might result from inter-individual variations in the platinum-detoxification pathway due to the expression of Glutathione-S-transferase (GST) enzymes. We hypothesized that *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms might have an impact as prognostic and predictive determinants for OC.

**Methods** We conducted a hospital-based study in a cohort of OC patients submitted to platinum-based chemotherapy. *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were determined by multiplex-PCR.

**Results** *GSTM1*-null genotype patients presented a significantly longer 5-year survival and an improved time to progression when compared to *GSTM1*-wt genotype patients (Log Rank test,  $P=0.001$  and  $P=0.013$ , respectively). Multivariate Cox regression analysis indicate that the inclusion of genetic information regarding *GSTM1* polymorphism increased the predictive ability of risk of death after OC platinum-based chemotherapy ( $c$ -index from 0.712 to 0.833). Namely, residual disease (HR, 4.90;  $P=0.016$ ) and *GSTM1*-wt genotype emerged as more important predictors of risk of death (HR, 2.29;  $P=0.039$ ;  $P=0.036$  after bootstrap). No similar effect on survival was observed regarding *GSTT1* polymorphism and there were no statistically significant differences between *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and the assessed patients' clinical-pathological characteristics.

**Conclusion** *GSTM1* polymorphism seems to have impact in OC prognosis as it predicts a better response to platinum-based chemotherapy and hence an improved survival. The characterization of the *GSTM1* genetic profile might be a useful molecular tool and a putative genetic marker for OC clinical outcome.

**Keywords:** epithelial ovarian cancer, GST, polymorphism, pharmacogenetic, platinum-based chemotherapy, predictive value

## 1. Introduction

Ovarian cancer (OC) is the third most common gynecological cancer among women worldwide, with an estimate of 239 000 new cases and 152 000 deaths each year. In Europe, OC is the fifth most incident cancer in women but represents the leading cause of death among gynecological tumors [1]. The high mortality rate is, in part, attributable to the usual absence of early symptoms of the disease and the lack of screening methods for early OC diagnosis. Consequently, the diagnosis is frequent at an advanced stage, with 75% of all cases being diagnosed at stage III and IV where the disease has spread throughout the abdominal cavity [2-4].

Standard treatment for OC patients is based on cytoreductive surgery, followed by first-line chemotherapy with platinum (cisplatin or carboplatin) and taxane agents (paclitaxel or docetaxel) [5]. OC is considered as a chemosensitive tumor, yielding chemotherapy response rates over 80%, inclusive with 40 to 60% complete responses for advanced disease stages. Paradoxically, despite this aggressive treatment approach and the apparent efficacy of treatment, up to 75% of patients will relapse within 12 and 18 months and become candidates for second-line chemotherapy [4,6]. Recurrent tumors may still be chemosensitive and patients can be re-submitted to platinum-based chemotherapy, with response rates directly proportional to the treatment-free interval, until the eventual emergence of drug-resistant disease [7]. As a result, the high percentage of late-stage diagnosis and the occurrence of tumor recurrence limit the treatment efficacy and the OC 5-year survival rate remains only around 45% [3].

The development of chemotherapy resistance is not fully understood and numerous studies are made to comprehend the biological mechanisms responsible for acquisition of resistance. The broad variability in the progression-free interval and its direct association with platinum response, coupled with the fact that up to a fifth of OC patients are intrinsically resistant to these compounds at presentation, hypothesized that inter-individual variation in drug response might be a major determinant for OC [8-17].

Upon exposure to cytotoxic drugs, several mechanisms are activated in order to keep cellular homeostasis [18-20]. Glutathione-S-transferases (GSTs) are a family of phase II metabolizing enzymes which contribute to detoxification by conjugation of glutathione to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds, including cytotoxic agents as the platinum-based ones [17,20,21]. The resulting glutathione-associated metabolites have increased solubility, which decrease the

amount of free intracellular metabolites and protect the cell from their reactive action. Consequently, a high GST pathway activity could result in prompt drug metabolism and excretion, decreasing the cellular concentration and the cytotoxic potential of platinum agents on tumor cells and hence conduct to an unfavorable therapeutic response [22-25].

Two of the GST genes (*GSTM1* and *GSTT1*) have been found to harbor functional polymorphisms that are frequently present in general population with a variable ethnic distribution [15,21,22,26,27]. The expression of *GSTM1* enzyme is directly related with the presence of the intact gene (*GSTM1*-wild type genotype, wt) since the absence of its activity is the result of a 15 kb deletion that spans the entire *GSTM1* gene (*GSTM1*-null genotype). Consequently, individuals homozygous for the *GSTM1*-null allele have a complete absence of *GSTM1* activity whereas *GSTM1*-wt homozygous patients are considered to have reference protein levels [21,28-31]. In Caucasians, the frequency of the *GSTM1* null genotype range from 42 to 60% [27,32]. *GSTT1* has a similar null polymorphism that has also been demonstrated to be associated with the absence of *GSTT1* expression and activity (*GSTT1*-null genotype) [31,33]. Between 13 to 26% of Caucasian population harbour homozygous deletion of *GSTT1* gene [27,32].

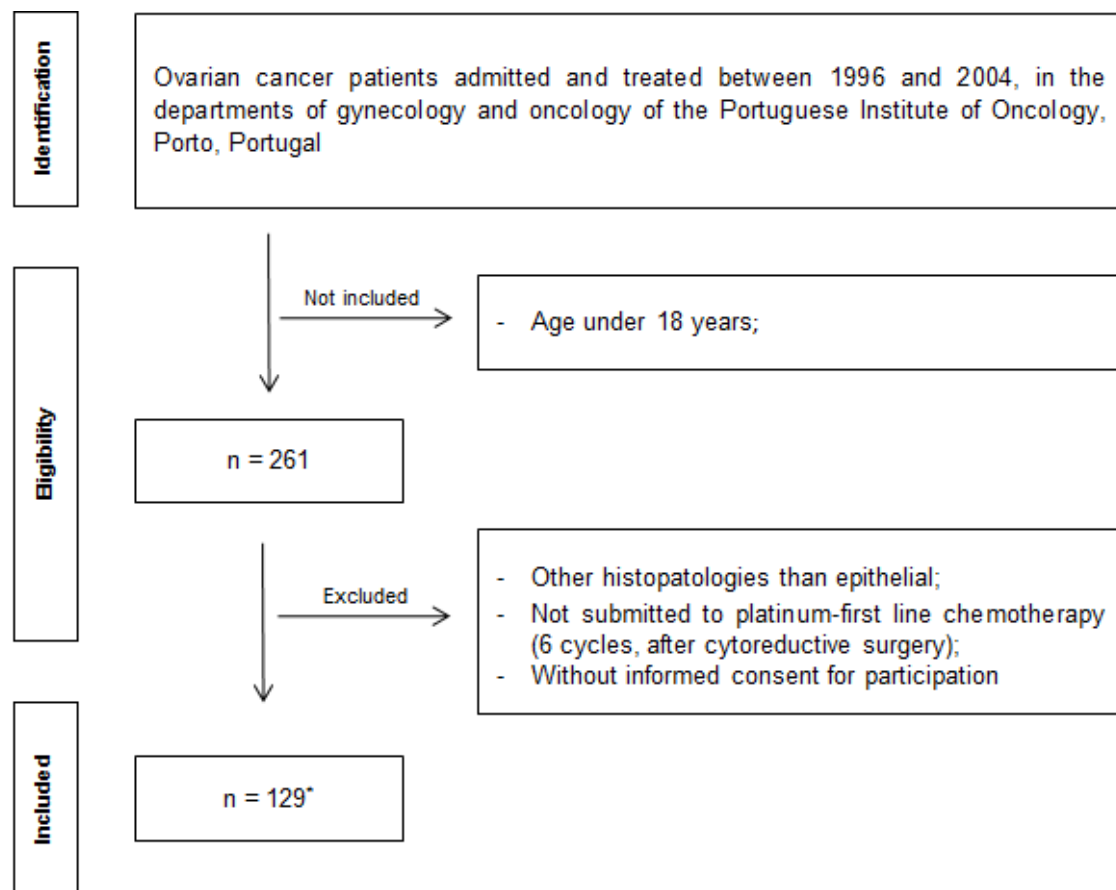
While *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms have been proposed as human susceptibility factors, mounting evidence suggests that GST polymorphisms might also have impact in patients' response to cytotoxic treatment and survival although no conclusive results are obtained [15,17,34-38]. Given the biochemical evidence that GST enzymes are involved in the detoxification of platinum compounds and the important impact of these compounds in OC treatment, we sought to determine whether genetic variations in this pathway could be of prognostic and predictive significance to platinum-based chemotherapy in OC patients.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Study Population

We conducted a hospital-based study on 261 European female patients with histologically confirmed ovarian cancer admitted and treated, between 1996 and 2004, in the departments of gynecology and oncology of the Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal. Within this group of patients were excluded those who did not have epithelial ovarian tumors and who not underwent first-line chemotherapy, consisting in paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) and cisplatin (75 mg/m<sup>2</sup>) or carboplatin (AUC 5-

7.5) at 21-day intervals for six cycles, after cytoreductive surgery (Figure 1, Supplemental Material). This combination chemotherapy was the standard treatment in our institute for these patients.



\* *GSTM1/GSTT1* polymorphism genotyping was only possible for 107 and 105 patients due to inconclusive genotyping analysis, respectively

**Fig.1** Flowchart regarding criteria for patient selection

Patients' clinical characteristics were obtained from their medical records. The tumor stage was evaluated according to the staging system of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) and the assessment of the tumor response to chemotherapy was based on World Health Organization (WHO) criteria.

The mean age of selected OC patients was 53 years, from which 55.8% were post-menopausal women and mainly diagnosed with advanced stage disease (FIGO III/IV; 65,1%). The distribution regarding to the extent of residual disease occurred as follows: optimal surgery was achieved in 49.6% of the cases whereas 11.6% and 26.4% presented residual disease  $\leq 2$  cm and  $> 2$  cm, respectively (no information available to 12.4% of the patients). Regarding histologic subtype, 52.7% of the patients

presented a tumor with serous differentiation, 17.1% mucinous, 15.5% clear cell, 8.5% endometrioid and the remaining 6.2% less common histologic subtypes.

Blood samples (n=129) were obtained with the written informed consent of participants prior to their inclusion in the study, according to Helsinki Declaration principles. The study was approved by the ethics committee of Portuguese Institute of Oncology - Porto. Blood samples were obtained with a standard technique and collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing tubes.

## 2.2. DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from the white blood cell fraction of each study subject by using QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN® 51106), according to the manufacturer's protocol.

*GSTs* genotypes were determined by multiplex-PCR (polymerase chain reaction) method adapted from a previously established protocol by Chen *et al.* [39]. This method simultaneously identifies *GSTM1/GSTT1* wild-type (wt) or null genotypes (homozygous deletion) by gene amplification. To ensure that the lack of PCR products was due to null alleles, an internal positive control was included in the multiplex PCR which targeted 268 bp of the  $\beta$ -globin gene.

The PCR products were then visualized by 3% (p/v) agarose gel electrophoresis, with ethidium bromide staining. The absence of an amplifiable 219 or 480 bp fragment (in the presence of 268 bp  $\beta$ -globin PCR product) indicates the presence of *GSTM1*-null or the *GSTT1*-null genotype, respectively. Patients were scored as *GSTM1*-wt or *GSTT1*-wt if the corresponding PCR products were generated, although no distinction was made between the presences of one or two alleles of these genes.

To ensure the quality control procedures implemented for genotype analysis, quality criteria were applied such as the blindly execution of all laboratory procedures to clinical and pathological features corresponding to each sample, inclusion of negative controls in all procedures and double sampling in 10% of the samples. Two authors independently confirmed the results. For study analysis, it was not possible to considered all the cases due to technical problems inherent to the performed laboratory techniques.



### 2.3. Statistical analysis

Analysis of data was performed using the computer software IBM® SPSS® Statistics for Windows™ (Version 22.0).

Chi-square analysis ( $\chi^2$ ) was used to compare the different categorical variables and a 5% level of significance was used in the analysis.

The probabilities of survival were calculated, and the means life tables were computed using the product-limit estimate of Kaplan-Meier method. The curves were examined by the Log-rank test, a statistical test for equality of survival distributions. A level of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Survival duration at 5-years was defined as the percentage of patients alive after 5 years of diagnosis. Time to progression at 5-years was estimated by a Cox proportional hazard model (HR, hazard ratio). This endpoint was defined as the 5-year interval between the first treatment and the first evidence of disease progression or the date of the last clinical evaluation of the patient, if the patient remained free of disease.

The association between several OC prognostic variables and *GSTM1* polymorphism with OC risk of death was estimated by Cox regression analysis. The concordance (*c*) index was used to compare the predictive ability of the proposed models. The predictive value was determined using the Harrell's concordance indexes, with  $c > 0.5$  being considered with good prediction ability [12,40-42]. The Cox regression proportional hazard model for *GSTM1* polymorphism was validated using a bootstrap resampling to investigate the stability of risk estimates (1000 replications).

Sample size and power of study (80%) were calculated using power and sample size program (version 3.1.2).

### 3. Results

The patients' clinical characteristics according to *GSTM1* and *GSTT1* genotypes are shown in Table 1. There were no significant statistical differences between the group of patients with reference GST activity (*GSTM1*-wt or *GSTT1*-wt genotype carriers) in comparison with the null GST activity (*GSTM1*-null or *GSTT1*-null genotype carriers) regarding age at diagnosis, hormonal status, FIGO stage, histologic subtype, tumor differentiation and extent of residual disease.

Table 1. Relation between *GSTM1* and *GSTT1* genotypes (reference or null activity genotype) and clinical pathological parameters in OC

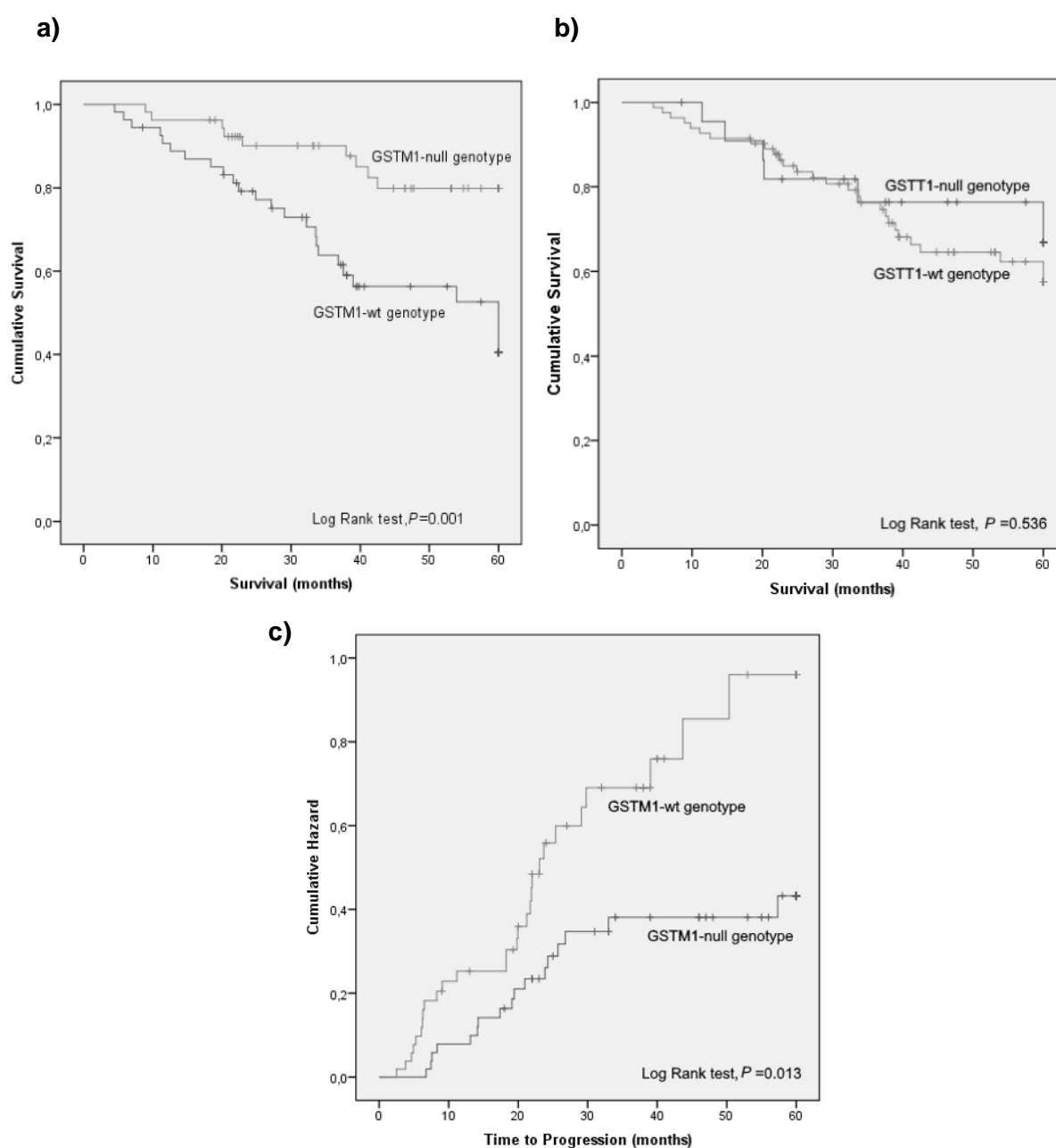
Parameter	wt/reference activity genotype	Null activity genotype	P
<i>GSTM1</i> genotype			
Age (years), mean ± SD	54.2 ± 14.3	51.7 ± 13.2	0.34**
Hormonal status			
Pre-menopause	24 (44.4%)	23 (43.4%)	0.91
Post-menopause	30 (55.6%)	30 (56.6%)	
FIGO stage			
I/II	15 (27.8%)	23 (43.4%)	0.19
III	30 (55.5%)	25 (47.2%)	
IV	9 (16.7%)	5 (9.4%)	
Histologic subtype			
Serous	29 (53.7%)	26 (49.1%)	0.63
Others	25 (46.3%)	27 (50.9%)	
Tumor differentiation			
Well differentiated	14 (25.9%)	10 (18.9%)	0.44
Non-well differentiated	38 (70.4%)	39 (73.6%)	
No information	2 (3.7%)	4 (7.5%)	
Residual Disease			
Optimal surgery	19 (35.2%)	31 (58.5%)	0.11
Residual tumor ≤ 2 cm	7 (13.0%)	5 (9.4%)	
Residual tumor > 2 cm	19 (35.2%)	12 (22.7%)	
No information	9 (16.6%)	5 (9.4%)	
<i>GSTT1</i> genotype			
Age (years), mean ± SD	53.7 ± 13.9	48.8 ± 12.7	0.13**
Hormonal status			
Pre-menopause	33 (40.2%)	14 (60.9%)	0.08
Post-menopause	49 (59.8%)	9 (39.1%)	
FIGO stage			
I/II	27 (32.9%)	10 (43.5%)	0.60
III	45 (54.9%)	10 (43.5%)	
IV	10 (12.2%)	3 (13%)	
Histologic subtype			
Serous	42 (51.2%)	12 (52.2%)	0.94
Others	40 (48.8%)	11 (47.8%)	
Tumor differentiation			
Well differentiated	20 (24.4%)	4 (17.4%)	0.72
Non-well differentiated	60 (73.2%)	15 (65.2%)	
No information	2 (2.4%)	4 (17.4%)	
Residual Disease			
Optimal surgery	36 (44%)	14 (61%)	0.27
Residual tumor ≤ 2 cm	11 (13.4%)	1 (4.3%)	
Residual tumor > 2 cm	23 (28.0%)	7 (30.4%)	
No information	12 (14.6%)	1 (4.3%)	

\*X<sup>2</sup> test with the exception of *t-student* analysis for the age comparison (\*\*)

Follow-up of this cohort of OC patients revealed that the survival probability at 5-years was 62% and the probability of a 5-years period without evidence of tumor progression was 53.6%. Concerning the 5-year survival curves according to the genetic background, obtained using Kaplan-Meier method and Log-Rank test, we observed that the mean survival rates were statistically different according to *GSTM1* patients'

genotypes. The group of patients with *GSTM1*-wt/reference activity genotypes present a statistically significant decreased 5-year survival when compared with patients with the *GSTM1* null genotype (43.9 vs 53.7 months; Log Rank test,  $P=0.001$ ) (Figure 2a). No similar effect on survival was observed according to *GSTT1* patients' genotypes (Log Rank test,  $P=0.536$ ) (Figure 2b).

Regarding time to progression, we observed that the *GSTM1* polymorphism was associated with OC-free survival at 5 years. We observed a significantly reduced time to progression in *GSTM1*-wt/reference activity genotype patients compared with *GSTM1*-null activity genotype patients (35.9 versus 46.6 months; Log Rank test,  $P=0.013$ ) (Figure 2c).



**Fig.2** Platinum-based chemotherapy response: the role of *GSTM1* and *GSTT1* genotypes on OC 5-year outcome. a) *GSTM1* polymorphism and survival: the group of patients with *GSTM1*-wt/reference activity genotype had a significantly diminished survival when compared with patients with *GSTM1*-null activity genotype (43.9 vs 53.7 months; Log Rank test,  $P=0.001$ ); b) *GSTT1* polymorphism and survival: no significant association was observed regarding the influence of *GSTT1* polymorphism and the OC 5-year survival (Log Rank test,  $P=0.536$ ); c) *GSTM1* polymorphism and time to progression: *GSTM1*-wt/reference activity genotype carriers presented a shorter time to progression when compared to *GSTM1*-null activity genotype patients (35.9 versus 46.6 months; Log Rank test,  $P=0.013$ ).

In a further step, using a multivariate Cox regression model, we assessed the influence of several OC prognostic variables and *GSTM1* polymorphism in the risk of death after OC platinum-based chemotherapy (Table 2). Moreover, *c*-indexes were included in the analysis to compare the predictive ability of the proposed models, being a *c*-index of 1 predictive of a perfect concordance [12,40-42].

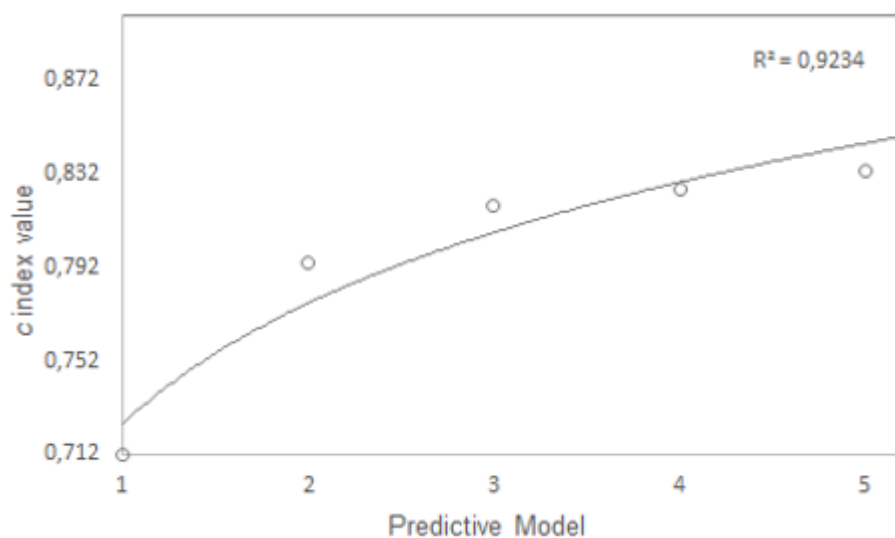
Table 2. Predictive models indicating risk of death after OC chemotherapy according to different prognostic factors

	HR	95% CI	<i>P</i>	<i>c</i> index
<b>Model 1</b>				
Advanced Tumor Stage	5.35	1.89-15.10	0.002	0.712
Hormonal Status <sup>a)</sup>	1.83	0.94-3.58	0.078	
<b>Model 2</b>				
Advanced Tumor Stage	1.79	0.55-5.77	0.331	0.794
Hormonal Status <sup>a)</sup>	1.37	0.69-2.70	0.363	
Residual Disease	7.12	2.40-21.08	<0.001	
<b>Model 3</b>				
Advanced Tumor Stage	1.96	0.61-6.28	0.260	0.818
Hormonal Status <sup>a)</sup>	1.21	0.60-2.44	0.588	
Residual Disease	7.19	2.43-21.30	<0.001	
Histological Subtype <sup>b)</sup>	1.21	0.97-1.50	0.096	
<b>Model 4</b>				
Advanced Tumor Stage	1.50	0.42-5.34	0.536	0.825
Hormonal Status <sup>a)</sup>	1.30	0.63-2.65	0.478	
Residual Disease	4.94	1.35-18.04	0.016	
<i>GSTM1</i> -wt genotype	2.40	1.10-5.21	0.028	
<b>Model 5</b>				
Advanced Tumor Stage	1.60	0.44-5.73	0.474	0.833
Hormonal Status <sup>a)</sup>	1.20	0.58-2.50	0.621	
Residual Disease	4.90	1.34-17.91	0.016	
<i>GSTM1</i> -wt genotype	2.29	1.04-5.03	0.039*	
Histological Subtype <sup>b)</sup>	1.14	0.89-1.45	0.291	

HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; \* $P=0.036$  after bootstrap based on 1000 samples; a) post-menopause; b) Serous vs others

Tumor stage and age, and the implicit hormonal status, are well-known prognostic determinants for OC survival. In our study, the predictive value of advanced tumor stage and hormonal status for OC risk of death was 0.712 (Model 1).

Residual disease after surgery also accounts as an important OC prognostic factor and we observed that the addition of this variable considerably increase the predictive value to 0.794 (Model 2). When further considering the impact of the histological sub-type, we observed an increase to 0.818 (Model 3). Regarding *GSTM1* polymorphism influence in the predictive ability (Model 4 and 5), we observed that the addition of the genetic information improved the capacity to predict death by OC in 11% and 12%, respectively, compared to Model 1. Specifically, evaluating a very stringent model (Model 5), we observed that residual disease after surgery (HR, 4.90; 95% CI, 1.34-17.91;  $P=0.016$ ) and *GSTM1*-wt genotype (HR, 2.29; 95% CI, 1.04-5.03;  $P=0.039$ ;  $P=0.036$  after bootstrap resampling based on 1000 samples) emerged as more important predictors of risk of death after OC platinum-based chemotherapy. As a result, the highest predictive value was reached in Model 5 when considering advanced tumor stage, hormonal status, residual disease, *GSTM1*-wt genotype and histological subtype ( $c=0.833$ ) (Table 2; Figure 3, Supplemental Material).



**Fig.3** Increase in the predictive ability of risk of death after OC chemotherapy according to the proposed predictive models ( $R^2=0,9234$ ).

#### 4. Discussion

Optimize OC standard treatment strategies and improve the rational and the cost-effective incorporation of emerging biological agents are domains of high priority research that would benefit from the identification of both prognostic and predictive biomarkers [9,43-45]. Currently, it is well accepted that inter-individual

variations, which are often associated to genetic polymorphism in specific genes, can be useful as prognostic and predictive factors for OC patients [8-17].

Platinum-based compounds are among the most active and used cytotoxic agents in the clinical practice, namely for OC treatment [47-50]. The conjugation of platinum compounds with glutathione, in a metabolic reaction performed by GST enzymes, can result in platinum inactivation and/or increased water solubility, which reduces the amount of free intracellular drug that is available to bind to its target and favors their elimination from the body [52]. Therefore, a decreased activity of this detoxification pathway, due to null or diminished expression of particular GST enzymes, could lead to a reduced metabolism, slower detoxification and higher pharmacological intracellular concentration of platinum-based compounds. Ultimately, could be yielded a prolonged platinum-cytotoxic effect and, consequently, a favorable treatment response and an improved patient survival [10,17,23,34,36,52]. Based on this assumption, we hypothesized that *GST* polymorphisms conferring null GST activity (*GSTM1*-null or *GSTT1*-null genotypes) might predispose to a favorable OC prognosis. In fact, this study was encouraged from a previous report from our group that revealed, in a small cohort of OC patients (n=24), a strong relationship between *GST* polymorphisms and disease outcome [15].

In the present study, we found that the group of patients with *GSTM1*-null genotype had significantly prolonged 5-year survival when compared with patients with *GSTM1*-wt/reference genotype (53.6 and 43.9 months, respectively,  $P=0.001$ ) (Figure 2a). Regarding *GSTT1* polymorphism, no significant association was observed between genotypes and OC 5-year survival ( $P=0.536$ ) (Figure 2b). Moreover, exploring the role of *GST* polymorphisms in OC outcome, we analyzed the time to progression (at 5 years) according to *GSTM1* genotypes. Our results demonstrate that *GSTM1*-null genotype patients presented an increased OC-free survival interval when compared to *GSTM1*-wt/reference genotype patients (46.6 and 35.9 months, respectively,  $P=0.013$ ) (Figure 2c). As suggested above, the results obtained with this study seemed to be concordant with the assumption that the reduced GST detoxification pathway activity, mainly due to a null expression of *GSTM1* enzyme, might reduce the platinum metabolism and promote a slower detoxification of these cytotoxic metabolites. As consequence, platinum-based metabolites are present in a higher intracellular concentration, which enhance the cytotoxic potential on tumor cells. Ultimately, a lower GST detoxification pathway could have impact in OC sensitiveness to chemotherapy and hence impact in the patient's outcome. Our data is in agreement with other studies which have also observed that reduced GST function has impact in

survival outcome of OC patients [15,34,36,38]. Nevertheless, to this date, inconsistent associations have been reported for *GST* polymorphisms and treatment outcome, especially for *GSTT1* deletion. Inclusive, deletion of *GSTT1* gene (*GSTT1*-null genotype) seems to be less relevant in the platinum-based treatment of patients with solid tumors than in hematologic diseases that are treated with a variety of non-platinum cytotoxic agents [53]. The present study is sufficiently powered to show a statistically significant difference regarding OC survival (statistical power of the risk of association over 80%). However, we suggest that large well-designed studies should be performed in the attempt to further strengthen our evidence and to provide a detailed analysis of the influence of *GST* polymorphisms in OC survival. It would be also of great interest to explore the role of genetic polymorphisms in other proteins involved in the platinum pathway, namely those involved in the cellular response to platinum-induced DNA damage. That might lead to the establishment of a genetic/molecular profile associated with platinum-based treatment response, identifying the major determinants involved in the acquisition of platinum-resistant/sensitive phenotypes and consequently OC predictive subgroups.

In the clinical practice, innumerable pathological factors are considered as prognostic factors for OC patients and many efforts are made to identify those that will improve OC patient's stratification and might be useful tools for therapeutic decisions. Clinical and pathological factors with proved prognostic impact in epithelial OC include age, FIGO stage, histologic subtype, tumor grade and residual tumor size after cytoreductive surgery. Nevertheless, tumor FIGO stage stands as the most important prognostic factor although optimal cytoreductive has evidenced impact in OC treatment response and survival [6,54,55]. For this cohort of OC patients, we evaluated the influence of established prognostic factors, according to some predictive models, in the risk of death after OC platinum-based chemotherapy (Table 2). The definition of a predictive model encompassing the clinical characteristics tumor stage, hormonal status, histological subtype and the extent of residual disease (Model 3) revealed the last parameter as the major clinical determinant for the risk of death (HR, 7.19; 95% CI, 2.43-21.30;  $P < 0.001$ ). Additional results revealed that the definition of predictive profiles that comprise information regarding clinical parameters plus *GSTM1* polymorphism information have higher ability to predict the risk of death by OC (Model 4 and 5;  $c = 0.825$  and  $0.833$ , respectively). Namely, in the most complex model (Model 5), both residual disease (HR, 4.90; 95% CI, 1.34-17.91;  $P = 0.016$ ) and *GSTM1*-wt genotype (HR, 2.29; 95% CI, 1.04-5.03;  $P = 0.039$ ;  $P = 0.036$  after bootstrap) emerged as more important predictors of risk of death after OC platinum-based

chemotherapy. Therefore, we hypothesize that the definition of a predictive profile that contains the *GSTM1* polymorphism information could be useful as molecular marker to predict the clinical response to platinum-based chemotherapy. To the best of our knowledge, this is the first study that evaluates the impact of adding *GSTM1* genetic information to several OC clinical prognostic variables in the risk of death after OC chemotherapy and the first to point the beneficial predictive ability in the combination of clinical plus genetic information. Therefore, additional studies should replicate this predictive model in another OC patients cohort submitted to first-line chemotherapy.

### **Conclusion and future directions**

Identifying the factors underlying the treatment response variability in OC patients has proved to be a challenge albeit the ability to predict platinum sensitivity prior to treatment has the potential to significantly improve or restore chemosensitivity in resistant and recurrent patients and hence the OC survival. Understanding platinum-treatment failure might be an essential step in the attempt to tailor chemotherapy, choosing the patients most likely to benefit from therapy, with the possibility to adjust treatment dosage and follow-up strategies. The present study suggests *GSTM1* polymorphism as a useful molecular marker to predict the response of OC patients to platinum-based first-line chemotherapy. Based on clinical and genetic markers, the definition of an integrative approach might be a crucial and innovative opportunity to yielding a substantial improvement in OC patient's survival.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests

**Compliance with Ethical Standards** All procedures performed in the present study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Conceived of or designed study – Deolinda Pereira and Rui Medeiros  
Performed research – Joana Assis, Mónica Gomes and Augusto Nogueira  
Analyzed data – Joana Assis, Deolinda Pereira and Rui Medeiros  
Wrote the paper – Joana Assis and Deolinda Pereira

### **References**



1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136 (5):E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
2. Cho KR, Shih Ie M (2009) Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 4:287-313. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59 (4):225-249. doi:10.3322/caac.20006
4. Romero I, Bast RC, Jr. (2012) Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* 153 (4):1593-1602. doi:10.1210/en.2011-2123
5. National Comprehensive Cancer Network. Ovarian cancer including Fallopian Tube Cancer and Primary Peritoneal Cancer (Version 2.2015). Accessed September 11, 2015
6. Bhoola S, Hoskins WJ (2006) Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 107 (6):1399-1410. doi:10.1097/01.AOG.0000220516.34053.48
7. Bookman MA (2003) Developmental chemotherapy and management of recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21 (10 Suppl):149s-167s
8. Lambrechts S, Lambrechts D, Despierre E, Van Nieuwenhuysen E, Smeets D, Debruyne PR, Renard V, Vroman P, Luyten D, Neven P, Amant F, Leunen K, Vergote I (2015) Genetic variability in drug transport, metabolism or DNA repair affecting toxicity of chemotherapy in ovarian cancer. *BMC Pharmacol Toxicol* 16:2. doi:10.1186/s40360-015-0001-5
9. Diaz-Padilla I, Amir E, Marsh S, Liu G, Mackay H (2012) Genetic polymorphisms as predictive and prognostic biomarkers in gynecological cancers: a systematic review. *Gynecol Oncol* 124 (2):354-365. doi:10.1016/j.ygyno.2011.10.034
10. Caiola E, Broggin M, Marabese M (2014) Genetic markers for prediction of treatment outcomes in ovarian cancer. *Pharmacogenomics J* 14 (5):401-410. doi:10.1038/tpj.2014.32
11. Paige AJ, Brown R (2008) Pharmaco(epi)genomics in ovarian cancer. *Pharmacogenomics* 9 (12):1825-1834. doi:10.2217/14622416.9.12.1825
12. Assis J, Pereira D, Gomes M, Marques D, Marques I, Nogueira A, Catarino R, Medeiros R (2013) Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile. *Int J Clin Exp Med* 6 (7):552-561
13. Pinto D, Pereira D, Portela C, da Silva JL, Lopes C, Medeiros R (2005) The influence of HER2 genotypes as molecular markers in ovarian cancer outcome. *Biochem Biophys Res Commun* 335 (4):1173-1178. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.012
14. Santos AM, Sousa H, Portela C, Pereira D, Pinto D, Catarino R, Rodrigues C, Araujo AP, Lopes C, Medeiros R (2006) TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 340 (1):256-262. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.176
15. Medeiros R, Pereira D, Afonso N, Palmeira C, Faleiro C, Afonso-Lopes C, Freitas-Silva M, Vasconcelos A, Costa S, Osorio T, Lopes C (2003) Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int J Clin Oncol* 8 (3):156-161. doi:10.1007/s10147-003-0318-8
16. Bergmann TK, Green H, Brasch-Andersen C, Mirza MR, Herrstedt J, Holund B, du Bois A, Damkier P, Vach W, Brosen K, Peterson C (2011) Retrospective study of the impact of pharmacogenetic variants on paclitaxel toxicity and survival in patients with ovarian cancer. *Eur J Clin Pharmacol* 67 (7):693-700. doi:10.1007/s00228-011-1007-6
17. Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B, Yu H (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol* 100 (2):330-337. doi:10.1016/j.ygyno.2005.08.035
18. Bozina N, Bradamante V, Lovric M (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* 60 (2):217-242. doi:10.2478/10004-1254-60-2009-1885
19. Weinshilboum R (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 348 (6):529-537. doi:10.1056/NEJMra020021
20. Klaassen CD (2008) *The Basic Science of Poisons*. Casarett & Doull's Toxicology 7th edition edn.,

21. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
22. Rabik CA, Dolan ME (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33 (1):9-23. doi:10.1016/j.ctrv.2006.09.006
23. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (7):3070-3074
24. Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10 (1):2-18. doi:10.1021/tx960072x
25. Agarwal R, Kaye SB (2003) Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3 (7):502-516. doi:10.1038/nrc1123
26. Paugh SW, Stocco G, McCorkle JR, Diouf B, Crews KR, Evans WE (2011) Cancer pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther* 90 (3):461-466. doi:10.1038/clpt.2011.126
27. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (12):1239-1248
28. Seidegard J, Pero RW (1988) The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11:125-126
29. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (19):7293-7297
30. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR (1998) Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 273 (6):3517-3527
31. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW (1996) A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 107 (2):229-233
32. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE (2006) Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 57:119-137. doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104724
33. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 ( Pt 1):271-276
34. Nagle CM, Chenevix-Trench G, Spurdle AB, Webb PM (2007) The role of glutathione-S-transferase polymorphisms in ovarian cancer survival. *Eur J Cancer* 43 (2):283-290. doi:10.1016/j.ejca.2006.09.011
35. Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, Leite JL, Granja F, Ward LS (2006) Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 132 (8):521-528. doi:10.1007/s00432-006-0099-3
36. Kim HS, Kim MK, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB (2009) Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study. *Gynecol Oncol* 113 (2):264-269. doi:10.1016/j.ygyno.2009.01.002
37. Khrunin A, Ivanova F, Moisseev A, Khokhrin D, Sleptsova Y, Gorbunova V, Limborska S (2012) Pharmacogenomics of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients of different ethnic origins. *Pharmacogenomics* 13 (2):171-178. doi:10.2217/pgs.11.140
38. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S (2010) Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J* 10 (1):54-61. doi:10.1038/tpj.2009.45
39. Chen CL, Liu Q, Relling MV (1996) Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 6 (2):187-191

40. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB (1996) Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 15 (4):361-387. doi:10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4
41. Teixeira AL, Ferreira M, Silva J, Gomes M, Dias F, Santos JI, Mauricio J, Lobo F, Medeiros R (2014) Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumour Biol* 35 (5):4057-4066. doi:10.1007/s13277-013-1531-3
42. Teixeira AL, Gomes M, Nogueira A, Azevedo AS, Assis J, Dias F, Santos JI, Lobo F, Morais A, Mauricio J, Medeiros R (2013) Improvement of a predictive model of castration-resistant prostate cancer: functional genetic variants in TGFbeta1 signaling pathway modulation. *PLoS One* 8 (8):e72419. doi:10.1371/journal.pone.0072419
43. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, Sorio R, Vergote I, Witteveen P, Bamias A, Pereira D, Wimberger P, Oaknin A, Mirza MR, Follana P, Bollag D, Ray-Coquard I (2014) Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32 (13):1302-1308. doi:10.1200/JCO.2013.51.4489
44. Tew WP, Colombo N, Ray-Coquard I, Del Campo JM, Oza A, Pereira D, Mammoliti S, Matei D, Scambia G, Tonkin K, Shun Z, Sternas L, Spriggs DR (2014) Intravenous aflibercept in patients with platinum-resistant, advanced ovarian cancer: results of a randomized, double-blind, phase 2, parallel-arm study. *Cancer* 120 (3):335-343. doi:10.1002/cncr.28406
45. Penzvalto Z, Surowiak P, Gyorffy B (2014) Biomarkers for systemic therapy in ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 14 (3):259-273
46. Yan L, Beckman R (2005) Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development. *Biotechniques* 39 (10 Suppl):S565-568. doi:10.2144/000112043
47. Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22 (47):7265-7279. doi:10.1038/sj.onc.1206933
48. Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7 (8):573-584. doi:10.1038/nrc2167
49. Muggia F (2009) Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 112 (1):275-281. doi:10.1016/j.ygyno.2008.09.034
50. Hogberg T (2010) Chemotherapy: Current drugs still have potential in advanced ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 7 (4):191-193. doi:10.1038/nrclinonc.2010.37
51. Shahzad MM, Lopez-Berestein G, Sood AK (2009) Novel strategies for reversing platinum resistance. *Drug Resist Updat* 12 (6):148-152. doi:10.1016/j.drug.2009.09.001
52. Marin JJ, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Macias RI (2012) Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 12 (4):402-438
53. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH (2011) Part 3: Pharmacogenetic variability in phase II anticancer drug metabolism. *Oncologist* 16 (7):992-1005. doi:10.1634/theoncologist.2010-0260
54. Matias-Guiu X, Davidson B (2014) Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 464 (3):315-331. doi:10.1007/s00428-013-1509-y
55. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ (2002) Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 20 (5):1248-1259



## **CAPÍTULO IV**



#### **4.1. Influence of *CYP3A4* genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy: implication of a *CYP3A4* activity profile**

**Running title:** CYP3A4 in Ovarian Cancer's Pharmacogenetic Profile

Joana Assis<sup>a,e</sup> (joanaassis@gmail.com) MSc, Deolinda Pereira<sup>b,c</sup> (deolindasp@yahoo.com) MD, Mónica Gomes<sup>a,b,e</sup> (monicagomes\_26@gmail.com) MSc, Dânia Marques<sup>c</sup> (dania.marques@hotmail.com) MSc, Inês Marques<sup>a</sup> (ines.santosmarques@gmail.com) MSc, Augusto Nogueira<sup>a,e</sup> (ajanogueira@hotmail.com) MSc, Raquel Catarino<sup>a</sup> (raqueclatarino@yahoo.com) PhD, Rui Medeiros<sup>a,b,d,e</sup> (ruimedei@ipoporto.min-saude.pt) Prof. Doutor

<sup>a</sup> Molecular Oncology Group – CI, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>b</sup> ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal

<sup>c</sup> Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>d</sup> CEBIMED, Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

<sup>e</sup> Research Department, Portuguese League against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal

#### **Corresponding author:**

Prof. Doutor Rui Medeiros

Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE

Grupo de Oncologia Molecular – CI, Edifício Laboratórios, 4º piso

Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

Telephone: +351 22 508 4000; Fax: +351 22 508 4001.

E-mail: ruimedei@ipoporto.min-saude.pt

## Abstract

CYP3A4 is a key enzyme involved in the metabolism of numerous compounds, such as paclitaxel, and its activity shows an extensive inter-individual variation which can influence treatment response. The study's purpose was to investigate the potential predictive role of a CYP3A4 profile (*CYP3A4\*1B*, rs2740574 and *CYP3A4\*22*, rs35599367) in serous ovarian cancer patients treated with first-line chemotherapy (paclitaxel and cisplatin or carboplatin), after cytoreductive surgery. *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22* genotypes were determined by Nested PCR-RFLP and Taqman® Allelic Discrimination, respectively. We observed that the mean survival rates were statistically different according the patients *CYP3A4* genotypes. The group of patients carrying the *CYP3A4\*1B* G allele present a decreased mean survival rate when compared with AA genotype patients (103.93 and 134.44 months, respectively,  $p=0.010$ ). This result is consistent after multivariate Cox regression analysis [HR, 2.15; 95% CI, 1.03-4.52;  $p=0.043$ ]. The combination of *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22* polymorphisms result in the definition of a CYP3A4 activity profile: the group of patients with a higher CYP3A4 activity profile had significantly diminished survival when compared with patients with a lower CYP3A4 activity profile (101.06 and 134.44 months, respectively,  $p=0.012$ ). Multivariate Cox regression analysis revealed a diminished overall survival time for patients with CYP3A4 high activity profile (HR, 2.29; 95% CI, 1.05-5.02;  $p=0.038$ ). The definition of a CYP3A4 activity profile resulted in the increase of prediction ability, using Harrel's concordance indexes (C-index from 0.617 to 0.626). To conclude, our results demonstrate an association between *CYP3A4\*1B* and a diminished overall survival of patients with serous ovarian cancer. The definition of a CYP3A4 activity profile proved to be benefic and the CYP3A4 high activity profile was associated with a lower overall survival. We consider that the definition of a CYP3A4 activity profile might be useful as molecular marker for predicting the clinical outcome of serous ovarian cancer patients.

**Keywords:** Serous Ovarian Cancer; CYP3A4; Polymorphism; Pharmacogenetic; Paclitaxel; Predictive Value



## 1. Introduction

Ovarian cancer (OC) is the third most common gynecological cancer among women worldwide, with an estimate 225 000 new cases and 140 000 deaths due to this disease each year [1]. In Europe, ovarian cancer is the fifth most incident cancer in women but the main cause of death among gynecological cancers [2].

Standard treatment for OC patients is based on cytoreductive surgery, followed by first-line chemotherapy with a platinum (cisplatin or carboplatin) and a taxane agent (paclitaxel or docetaxel). However, despite this aggressive approach, the 5-year survival rates remains only around 45% [3]. The high fatality rate results in part from the frequent diagnosis of OC at an advanced stage, with 75% of all cases being diagnosed in stage III and IV [4, 5]. Furthermore, although nearly 80% of patients initially respond to treatment, long-term survival remains poor because of eventual tumor recurrence and emergence of drug-resistant disease [6].

The development of chemotherapy resistance is poorly understood and many investigations are made to comprehend the biological mechanisms responsible for acquisition of resistance. Although many non-genetic factors may influence the effects of therapy, there are numerous studies that show that inter-individual differences in drug response and toxicities can be due to genetic polymorphisms in genes encoding drug-metabolizing enzymes, drug transporters and drug targets. Therefore, genetic polymorphisms in these genes can be useful as prognostic and predictive markers in cancer, namely in OC [7-12].

One of the most studied drug-metabolizing enzymes is CYP3A4 (Cytochrome P450, family 3, subfamily A, Polypeptide 4), a key enzyme involved in the metabolism of numerous exogenous and endogenous compounds, accounting for 30-60% of total liver cytochrome P-450 protein [13-15]. Compounds metabolized by CYP3A4 include chemotherapeutic agents like tamoxifen or taxanes, namely paclitaxel [16-18].

CYP3A4 activity or protein content shows 10 to 100 fold inter-individual variation, influencing drug response/toxicity and hence therapy outcome [15, 19-21]. The most known and studied *CYP3A4* polymorphism is *CYP3A4\*1B* (rs2740574), which consists in an A/G transition in the promoter region at position -392 (A-392G) [22]. Initially, *CYP3A4\*1B* G allele was associated with an increased CYP3A4 activity due to reduced binding of transcriptional repressor [23]. Nevertheless, besides being intensively studied, the biological effect of *CYP3A4\*1B* polymorphism is still controversial although remaining as one of the most important polymorphisms in *CYP3A4* gene [18, 23-32].

Recently, Wang and collaborators identified a functional SNP (Single Nucleotide Polymorphism) located in intron 6 of *CYP3A4* gene (*CYP3A4*\*22 C/T, rs35599367), which markedly affects expression of *CYP3A4* and could be a promising biomarker for predicting response to *CYP3A4*-metabolized drugs [33]. This study showed that *CYP3A4*\*22 is significantly linked to an early defect in transcription and RNA processing and could affect the folding of single-stranded DNA or nascent RNA and hence RNA elongation, potentially affecting the binding of regulatory proteins. Consequently, *CYP3A4*\*22 T allele was associated with the decreased *CYP3A4* mRNA expression and enzymatic activity [33].

For its role in the metabolism of chemotherapeutic agents, including paclitaxel, inter-individual differences in expression of *CYP3A4* enzyme can be conditional for different responses to the first-line treatment of OC, affecting the patients overall survival. The main purpose of this work was to investigate the potential predictive role of *CYP3A4*\*1B polymorphism in OC patients treated with paclitaxel/platinum first-line chemotherapy. Additionally, we also intended to combine *CYP3A4*\*1B and *CYP3A4*\*22 genotypes in order to evaluate the overall survival rates according to a *CYP3A4* activity profile.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Patients**

We conducted a hospital-based study on 261 European female patients with histologically confirmed ovarian cancer admitted and treated, between 1996 and 2009, in the departments of gynecology and oncology of the Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal. Within this group of patients were excluded those who did not have serous ovarian tumors and who did not underwent first-line chemotherapy, consisting in paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) and cisplatin (75 mg/m<sup>2</sup>) or carboplatin (AUC 5-7.5) at 21-day intervals for six cycles, after cytoreductive surgery. This combination chemotherapy was the standard treatment in our institute for these patients. The therapy was concluded when objective disease progression was observed or unacceptable toxicity appeared. Patients' clinical characteristics were obtained from their medical records (n=120). The tumor stage was evaluated according to the staging system of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) and the assessment of the tumor response to chemotherapy was based on World Health Organization (WHO) criteria. Blood samples were obtained with the written

informed consent of participants prior to their inclusion in the study, according to Helsinki Declaration principles. The study was approved by the ethics committee of Portuguese Institute of Oncology - Porto.

## **2.2. DNA extraction and genotyping**

Blood samples were obtained with a standard technique and collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing tubes. Genomic DNA was extracted from the white blood cell fraction of each study subject by using QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's protocol.

*CYP3A4\*1B* genotypes were determined by Nested PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) method adapted from a previously established protocol by Zeigler-Johnson *et al.* [34]. The restriction fragments were then visualized by 3% (p/v) agarose gel electrophoresis, with ethidium bromide staining. Three types of band patterns were obtained: wild type homozygote (A/A), one band corresponding to 207 bp; heterozygote (A/G), three bands corresponding to 18, 189 and 207 bp; polymorphic homozygote (G/G), two bands corresponding to 18 and 189 bp.

The *CYP3A4\*22* genotyping was performed using Taqman® Allelic Discrimination (C\_\_59013445\_10). All allelic discrimination PCR reactions were carried out in 6 µL volumes using 2.5 µL of TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X), 0.125 µL of 40x assay mix, 2.375 µL of sterile water and 1 µL of genomic DNA. Amplification of DNA was carried out using the following amplification conditions: 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data capture and analysis was carried through the ABI7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and the Sequence Detection Systems software (Applied Biosystems version 1.2.3).

Quality control was assured by the use of non-template controls in all runs and blind replicate genotype assessment on 10% of the samples.

## **2.3. Statistical analysis**

Analysis of data was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) computer software for Windows™ (Version 17.0). Differences in proportions

were evaluated by the  $\chi^2$  test. The probabilities of survival were calculated and the means life tables were computed using the product-limit estimate of Kaplan-Meier method. The curves were analyzed by the Breslow (generalized Wilcoxon) test, a statistical test for equality of survival distributions. A level of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Survival duration was defined as the time between diagnosis and either death or the time of the last clinical evaluation of the patient. Cause of death was determined from the patient's records, death certificate, or by speaking with her general practitioner.

The associations between *CYP3A4* polymorphisms and survival were estimated by Cox regression analysis. Cox regression models were used to adjust for potential confounders with *CYP3A4* genotypes fitted as indicator variables. The concordance (*c*) index was used to compare the predictive ability of *CYP3A4* genotypes, with  $C > 0.5$  being considered with good prediction ability.

In relation to *CYP3A4* activity profile, based on published data, we defined that patients carrying *CYP3A4\*1B* G allele or *CYP3A4\*22* CC genotype have a *CYP3A4* high activity profile whereas patients with *CYP3A4\*1B* AA genotype or carrying *CYP3A4\*22* T allele have a *CYP3A4* low activity profile [18, 23, 33, 35-38].

### 3. Results

The patients' clinic characteristics according to *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22* genotypes are shown in Table 1. There were no significant statistical differences between the group of patients with the high activity genotype (*CYP3A4\*1B* G carriers or *CYP3A4\*22* CC genotype) and the low activity genotype (*CYP3A4\*1B* AA genotype or *CYP3A4\*22* T carriers) regarding age at diagnosis, clinical stage, histological subtype, hormonal status, extent of residual disease, relapse or survival. Furthermore, we assessed the patients' clinic characteristics according to *CYP3A4* activity profile (Table 2). Likewise, there were no significant statistical differences between the *CYP3A4* activity profiles and the clinicopathological parameters assessed.

**Table 1.** Relation between *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22* genotypes (high or low activity genotype) and clinicopathological parameters in serous OC.

Parameter	High activity genotype <sup>a)</sup>	Low activity genotype <sup>b)</sup>	<i>p</i> <sup>*</sup>
<b>CYP3A4*1B genotype</b>			
Age (years), mean ± SD	50.3 ± 11.2	50.8 ± 10.6	0.78**
FIGO stage			
I/II	2 (12.5%)	22 (21.2%)	0.42
III/IV	14 (87.5%)	82 (78.8%)	
Hormonal Status			
Pre-menopause	5 (31.3%)	36 (37.1%)	0.40
Post-menopause	11 (68.7%)	61 (62.9%)	
Residual Disease			
Optimal Surgery	4 (26.7%)	30 (32.6%)	0.85
Residual tumor ≤ 2 cm	3 (20%)	14 (15.2%)	
Residual tumor > 2 cm	8 (53.3%)	48 (52.2%)	
Relapse			
Yes	11 (73.3%)	61 (61.6%)	0.42
No	4 (26.7%)	38 (38.4%)	
Survival			
Alive with no evidence of cancer	7 (43.8%)	64 (63.4%)	0.14
Dead, or alive with evidence of cancer	9 (56.2%)	37 (36.6%)	
<b>CYP3A4*22 genotype</b>			
Age (years), mean ± SD	53.9 ± 12.3	54.6 ± 12.5	0.88**
FIGO stage			
I/II	17 (18.3%)	2 (33.3%)	0.36
III/IV	76 (81.7%)	4 (66.7%)	
Hormonal Status			
Pre-menopause	33 (37.5%)	3 (60%)	0.32
Post-menopause	55 (62.5%)	2 (40%)	
Residual Disease			
Optimal Surgery	28 (32%)	2 (40%)	0.60
Residual tumor ≤ 2 cm	15 (17%)	-	
Residual tumor > 2 cm	45 (51%)	3 (60%)	
Relapse			
Yes	58 (63.7%)	4 (80%)	0.11
No	33 (36.3%)	1 (20%)	
Survival			
Alive with no evidence of cancer	52 (55.9%)	4 (66.7%)	0.60
Dead, or alive with evidence of cancer	41 (44.1%)	2 (33.3%)	

\*  $\chi^2$  test with the exception of *t-student* analysis for the age comparison (\*\*)

a) For *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22*, G carrier genotype and CC genotype were considered as high activity genotypes, respectively.

b) For *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22*, AA genotype and T carrier genotype were considered as low activity genotypes, respectively.

**Table 2.** Relation between CYP3A4 activity profile (high or low activity profile) and clinicopathological parameters in serous OC.

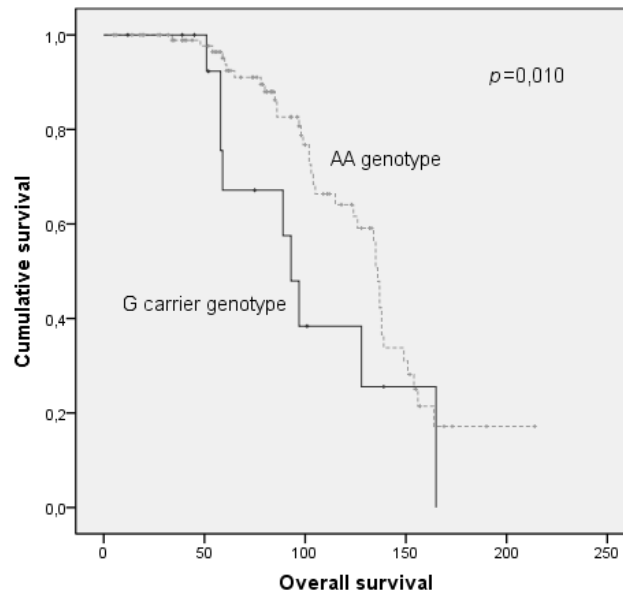
Parameter	High activity profile <sup>a)</sup>	Low activity profile <sup>b)</sup>	<i>p</i> *
Age (years), mean ± SD	50.5 ± 11.7	50.9 ± 10.7	0.88**
FIGO stage			
I/II	-	22 (21.2%)	0.66
III/IV	13 (100%)	82 (78.8%)	
Hormonal Status			
Pre-menopause	5 (38.5%)	36 (37%)	0.93
Post-menopause	8 (61.5%)	61 (63%)	
Residual Disease			
Optimal Surgery	2 (16.7%)	28 (34.6%)	0.40
Residual tumor ≤ 2 cm	3 (25%)	12 (14.8%)	
Residual tumor > 2 cm	7 (58.3%)	41 (50.6%)	
Relapse			
Yes	9 (75%)	61 (61.6%)	0.32
No	3 (25%)	38 (38.4%)	
Survival			
Alive with no evidence of cancer	5 (38.5%)	64 (63.4%)	0.08
Dead, or alive with evidence of cancer	8 (61.5%)	37 (36.6%)	

\*  $\chi^2$  test with the exception of *t-student* analysis for the age comparison (\*\*)

a) *CYP3A4\*1B* G carrier or *CYP3A4\*22* CC genotype were considered as high activity profile

b) *CYP3A4\*1B* AA genotype or *CYP3A4\*22* T carrier were considered as low activity profile

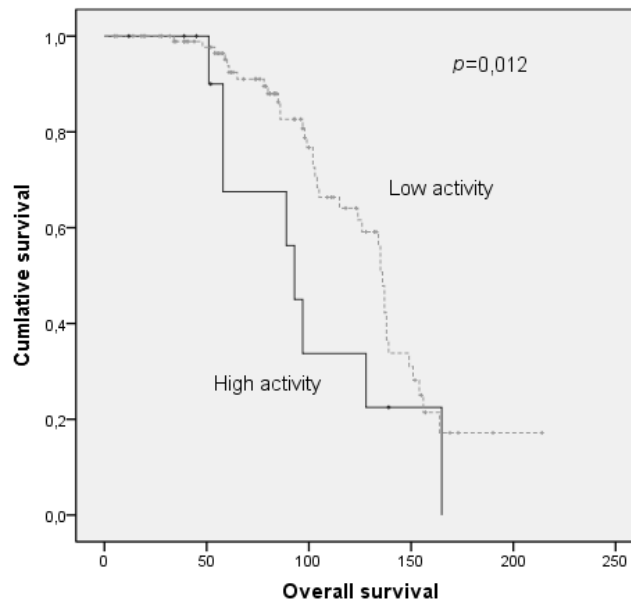
Concerning the overall survival rates obtained using Kaplan-Meier method and Breslow test, we observed that the mean survival rates were statistically different according to *CYP3A4\*1B* patients' genotypes. The group of patients with G allele carrier genotypes had significantly diminished survival when compared with patients with AA genotype (103.93 and 134.44 months, respectively,  $p=0.010$ ) (Figure 1). Thus, individuals with AG/GG genotypes showed a lower overall survival, conferring a worse prognosis for G allele carrier patients. Using a multivariate Cox regression model, we found a diminished overall survival for G carrier patients, when compared with AA genotype, with age as covariate [hazard ratio (HR), 2.15; 95% confidence interval (95% CI), 1.03-4.52;  $p=0.043$ ].



**Figure 1.** Overall survival by Kaplan-Meier and Breslow test of serous OC patients, according to *CYP3A4\*1B* genotypes. The group of patients with G allele carrier genotypes had significantly diminished survival when compared with patients with AA genotype (HR, 2.15; 95% CI, 1.03-4.52;  $p=0.043$ ).

Additionally, we analyzed the overall survival rates according CYP3A4 activity profile. The group of patients with a higher CYP3A4 activity profile had significantly diminished survival when compared with patients with a lower CYP3A4 activity profile (101.06 and 134.44 months, respectively,  $p=0.012$ ) (Figure 2). We observed that 5-year survival rate was 68% and 94% for patients with high activity and low activity profile, respectively. Once again, using a Cox regression model with age as covariate, we found that individuals with a higher activity profile had an inferior survival when compared to individuals with a lower activity profile (HR, 2.29; 95% CI, 1.05-5.02;  $p=0.038$ ). Therefore, individuals with *CYP3A4\*1B* G carrier genotype or *CYP3A4\*22* CC genotype (high activity profile) had a lower overall survival than individuals with *CYP3A4\*1B* AA genotype or *CYP3A4\*22* T carrier (low activity profile).

The increased predictive value of CYP3A4 high activity profile compared to *CYP3A4\*1B* polymorphism, in relation to serous OC overall survival, was assessed with Harrell's concordance indexes, with an improvement in the prediction ability from 0.617 to 0.626.



**Figure 2.** Overall survival by Kaplan-Meier and Breslow test of serous OC patients, according to CYP3A4 activity profile. The group of patients with a higher CYP3A4 activity profile had significantly diminished survival when compared with patients with a lower CYP3A4 activity profile (HR, 2.29; 95% CI, 1.05-5.02;  $p=0.038$ ).

#### 4. Discussion

Ovarian cancer is one of the most common causes of cancer-related death among women and the major cause of death due to gynecological cancer [2]. This high mortality rate is mainly due to the late diagnosis of the disease, frequently detected at advanced stages, and to the low rate of therapy efficacy, with a great number of the patients developing resistance to therapy and a consequently recurrence of the disease [5, 6, 39, 40]. Nowadays, it is accepted that inter-individual variations among patients, which are often associated to genetic polymorphisms in specific genes, can be responsible for different responses to the therapy as well as being useful as prognostic and predictive factors [7-9, 41-44].

The CYP3A4 enzyme, essential for phase I metabolism, can metabolize a panoply of endogenous and exogenous compounds, promoting their transformation in hydrophilic compounds easily eliminated by the organism [13, 14]. One of the most important oncologic drugs utilized in the clinical practice is paclitaxel and, like the other members of the taxanes family, it mediates their cytotoxic effect by the polymerization and stabilization of the microtubules, conducting to the arrest of cellular cycle in G2/M transition and to apoptosis [45]. Paclitaxel is partially metabolized by CYP3A4 enzyme and the resulting metabolites are less toxic and are



present in a lower concentration in plasma when compared with the initial compound. In this way, the resulting metabolites are less potent than paclitaxel and it seems like they don't have a significant therapeutic effect [46, 47].

CYP3A4 shows great importance in a metabolic level and is greatly studied in the field of translational research with many efforts to identify genetic variation in CYP3A4 gene capable to alter enzyme activity. Despite its controversial biological significance, many studies continue to assess the predictive role of *CYP3A4\*1B* in cancer research [27, 48-51]. However, to the best of our knowledge there are few studies that evaluate the role of this polymorphism as prognostic factor and none of them in relation to OC overall survival. Our results demonstrate an association between *CYP3A4\*1B* and a diminished survival of patients with serous OC. Multivariate Cox regression analysis indicated a decreased overall survival for *CYP3A4\*1B* G carrier, when compared with AA genotype, after adjustment for age (HR, 2.15; 95% CI, 1.03-4.52;  $p=0.043$ ). As suggested by previous published studies, we believe that the presence of the G allele of *CYP3A4\*1B* polymorphism might increase the CYP3A4 activity [18, 23, 35-37]. This increased activity might be responsible for a great metabolism of paclitaxel to less active metabolites, which are less effective in the treatment of OC, conducting to the development of resistance phenotypes and, consequently, to a worse therapy efficacy. Consistent with enhanced expression of the minor allele, G allele carrying patients had a decrease of overall survival around 31 months ( $p=0.010$ ).

Regarding the contradictory results about the effect of *CYP3A4\*1B* polymorphism, a newly discovered SNP in intron 6 may now introduces new knowledge and assists in the explanation of the inter-individual variation in CYP3A4 activity [33]. In this way, as suggested by the literature, we define a CYP3A4 activity profile using *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22* genotypes: individuals *CYP3A4\*1B* G carriers or with *CYP3A4\*22* CC genotype have a CYP3A4 high activity profile whereas individuals with *CYP3A4\*1B* AA genotype or *CYP3A4\*22* T carriers have a CYP3A4 low activity profile [18, 23, 33, 35-38]. Using these combinations, we observed a significant association between the high activity profile and a diminished overall survival of serous OC patients. Combining *CYP3A4* genotypes revealed a decreased of overall survival around 34 months to patients with a high activity profile ( $p=0.012$ ). Multivariate Cox regression analysis, with age as covariate, indicated a decreased overall survival for CYP3A4 high activity profile, when compared with low activity profile (HR, 2.29; 95% CI, 1.05-5.02;  $P=0.038$ ). This result, which is in agreement with the literature, indicated that as occurs with *CYP3A4\*1B* G allele, patients with

*CYP3A4\*22* CC genotype have an enhanced enzymatic activity and, presumably, a higher capability to metabolize paclitaxel to less active metabolites [33, 38]. Additional data showed that the definition of CYP3A4 activity profiles increased the significance of the observed effects in the outcome of serous OC patient, with an improvement in the prediction ability for CYP3A4 high activity profile (C-index from 0.617 to 0.626).

Although serous tumors are frequently characterized as having an aggressive behavior but usually being good responders to standard chemotherapy, the increase of activity of CYP3A4 might conduct to the acquisition of a resistance phenotype by serous OC and consequently to a lower overall survival of these patients [6, 52].

In this study, we investigate one of the most important and studied metabolizing enzymes with a putative impact on the pharmacokinetics of paclitaxel. Under this assumption, we thought that genetic polymorphisms are capable to alter CYP3A4 activity and consequently influence survival of serous OC patients submitted to first-line chemotherapy. However, additional studies are required to confirm our findings and to provide more detailed analysis of the influence of these polymorphisms in ovarian cancer patients' survival. The influence in survival of serous OC patients might be due directly through the excessive clearance of paclitaxel or indirectly through the diminished concentration of active paclitaxel in the tumor microenvironment since *CYP3A4* is not only expressed in the digestive tract but also in the ovary [53]. Consequently, it would be a future aim to combine the studied *CYP3A4* polymorphisms with other genetic polymorphisms in metabolic enzymes, such in *CYP3A5*, *CYP2C8* or Glutathione S-Transferases (*GSTM1* and *GSTT1*), and in drug transporters, such in *ABCB1*, to evaluate their impact in first-line chemotherapy response, either alone or in combination. In this study we did not directly measure CYP3A4 expression or activity so further research is planned to quantify the impact of *CYP3A4\*1B* and *CYP3A4\*22* on CYP3A4 activity and paclitaxel biotransformation, as performed by Henningsson and colleagues [57].

Nowadays, new strategies have been developed in order to overtake the problematic of resistance to treatment and to improve clinical outcome in advanced-stage ovarian cancer. One of the strategies to enhance anti-tumor activity and prolong survival is the dose-dense weekly administration of paclitaxel [54-58]. In a study developed by Leiser and colleagues [59], their pharmacokinetics findings suggest that repeated doses of weekly paclitaxel might induce its own hepatic metabolism. In general, paclitaxel dose is determined by the patient's body surface area rather than by the patient's metabolic profile. Inter-individual differences in paclitaxel metabolism

can implicate major alterations in blood concentration of paclitaxel and its metabolites with implication in toxicity and treatment efficacy [60-62].

## **5. Conclusion**

To the best of our knowledge this is the first study that evaluates the presence of *CYP3A4\*1B* polymorphism in the overall survival of OC patients and the first study to evaluate the influence of the new genetic *CYP3A4* intron 6 polymorphism in ovarian cancer patients. We consider that both polymorphisms might alter *CYP3A4* activity and affect consequently dose requirements, response and toxicity to drugs with a narrow therapeutic window as chemotherapy agents. Therefore, the definition of a *CYP3A4* activity profile could help to define a pharmacogenetic profile of serous OC, improving the clinical response of these patients to the standard first-line regimen. With the development of new therapeutic regimens for advanced ovarian cancer, the *CYP3A4* activity evaluation can also be important in the prediction of weekly dose-dense paclitaxel regimen effectiveness.

## **Conflict of interest**

The authors have declared that no competing interests exist.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Research Department of Portuguese League against Cancer (NRNorte) and Minister of Health of Portugal (CFICS-45/2007).

## References

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;
- [2] Ferlay J, Parkin DM and Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765-781.
- [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T and Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
- [4] Medel NIB, Wright JD and Herzog TJ. Targeted therapies in epithelial ovarian cancer. *J Oncol* 2010; 2010: 314326.
- [5] Bhoola S and Hoskins WJ. Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 1399-1410.
- [6] Bookman MA. Developmental chemotherapy and management of recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 149s-167s.
- [7] Pinto D, Pereira D, Portela C, da Silva JL, Lopes C and Medeiros R. The influence of HER2 genotypes as molecular markers in ovarian cancer outcome. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 1173-1178.
- [8] Medeiros R, Pereira D, Afonso N, Palmeira C, Faleiro C, Afonso-Lopes C, Freitas-Silva M, Vasconcelos A, Costa S, Osorio T and Lopes C. Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int J Clin Oncol* 2003; 8: 156-161.
- [9] Santos AM, Sousa H, Portela C, Pereira D, Pinto D, Catarino R, Rodrigues C, Araujo AP, Lopes C and Medeiros R. TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 256-262.
- [10] Bergmann TK, Green H, Brasch-Andersen C, Mirza MR, Herrstedt J, Holund B, du Bois A, Damkier P, Vach W, Brosen K and Peterson C. Retrospective study of the impact of pharmacogenetic variants on paclitaxel toxicity and survival in patients with ovarian cancer. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; 67: 693-700.
- [11] Gajjar K, Owens G, Sperrin M, Martin-Hirsch PL and Martin FL. Cytochrome P1B1 gene (CYP1B1) polymorphisms and ovarian cancer risk: A meta-analysis. *Toxicology* 2012;
- [12] Peethambaram P, Fridley BL, Vierkant RA, Larson MC, Kalli KR, Elliott EA, Oberg AL, White KL, Rider DN, Keeney GL, Cunningham JM, Hartmann LC and Goode EL. Polymorphisms in ABCB1 and ERCC2 associated with ovarian cancer outcome. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011; 2: 185-195.
- [13] Bozina N, Bradamante V and Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009; 60: 217-242.
- [14] Burk O and Wojnowski L. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: 105-124.
- [15] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 414-423.
- [16] Rodriguez-Antona C and Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006; 25: 1679-1691.
- [17] van Schaik RH. Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Invest New Drugs* 2005; 23: 513-522.
- [18] Chu W, Fyles A, Sellers EM, McCready DR, Murphy J, Pal T and Narod SA. Association between CYP3A4 genotype and risk of endometrial cancer following tamoxifen use. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2139-2142.
- [19] Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB and Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 201-205.
- [20] Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR and Ingelman-Sundberg M. Comparative analysis of CYP3A

- expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 755-761.
- [21] Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG and Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1271-1294.
- [22] Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ and Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1225-1229.
- [23] Amirmani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF and Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42: 299-305.
- [24] Nogal A, Coelho A, Catarino R, Morais A, Lobo F and Medeiros R. The CYP3A4 \*1B polymorphism and prostate cancer susceptibility in a Portuguese population. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 177: 149-152.
- [25] Zhang W, Chang YZ, Kan QC, Zhang LR, Li ZS, Lu H, Wang ZY, Chu QJ and Zhang J. CYP3A4\*1G genetic polymorphism influences CYP3A activity and response to fentanyl in Chinese gynecologic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 61-66.
- [26] Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA and Rebbeck TR. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13176-13181.
- [27] Rodrigues IS, Kuasne H, Losi-Guembarovski R, Fuganti PE, Gregorio EP, Kishima MO, Ito K, de Freitas Rodrigues MA and de Syllos Colus IM. Evaluation of the influence of polymorphic variants CYP1A1\*2B, CYP1B1\*2, CYP3A4\*1B, GSTM1\*0, and GSTT1\*0 in prostate cancer. *Urol Oncol* 2010;
- [28] Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG and Stricker BH. Influence of genetic variation in CYP3A4 and ABCB1 on dose decrease or switching during simvastatin and atorvastatin therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2010; 19: 75-81.
- [29] Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, Hopper JL, Chen X, Purdie DM, McCredie MR, Giles GG, Chenevix-Trench G and Liddle C. The CYP3A4\*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 355-366.
- [30] Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ and Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 82-91.
- [31] Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N and Hall J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66: 288-294.
- [32] He BX, Shi L, Qiu J, Tao L, Li R, Yang L and Zhao SJ. A functional polymorphism in the CYP3A4 gene is associated with increased risk of coronary heart disease in the Chinese Han population. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108: 208-213.
- [33] Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE and Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* 2011; 11: 274-286.
- [34] Zeigler-Johnson CM, Walker AH, Mancke B, Spangler E, Jalloh M, McBride S, Deitz A, Malkowicz SB, Ofori-Adjei D, Gueye SM and Rebbeck TR. Ethnic differences in the frequency of prostate cancer susceptibility alleles at SRD5A2 and CYP3A4. *Hum Hered* 2002; 54: 13-21.
- [35] Kadlubar FF, Berkowitz GS, Delongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, Lamba J, Schuetz E and Wolff MS. The CYP3A4\*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 327-331.
- [36] Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, Legendre C and Thervet E. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005; 5: 595-603.
- [37] Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W and van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and

- MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 245-254.
- [38] Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T and van Schaik RH. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem* 2011; 57: 1574-1583.
- [39] Farley J, Ozbun LL and Birrer MJ. Genomic analysis of epithelial ovarian cancer. *Cell Res* 2008; 18: 538-548.
- [40] Bast RCJ, Hennessy B and Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 415-428.
- [41] Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, Schmitt F and Lopes C. Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis* 2004; 7: 53-58.
- [42] Nogueira A, Catarino R, Faustino I, Nogueira-Silva C, Figueiredo T, Lombo L, Hilario-Silva I, Pereira D and Medeiros R. Role of the RAD51 G172T polymorphism in the clinical outcome of cervical cancer patients under concomitant chemoradiotherapy. *Gene* 2012; 504: 279-283.
- [43] Silva J, Teixeira AL, Lobo F, Mauricio J and Medeiros R. DNA Repair System and Prostate Cancer Progression: The Role of NBS1 Polymorphism (rs1805794). *DNA Cell Biol* 2012;
- [44] Catarino R, Araujo A, Coelho A, Gomes M, Nogueira A, Lopes C and Medeiros RM. Prognostic significance of telomerase polymorphism in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3706-3712.
- [45] Clarke SJ and Rivory LP. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36: 99-114.
- [46] Klein TE, Chang JT, Cho MK, Easton KL, Ferguson R, Hewett M, Lin Z, Liu Y, Liu S, Oliver DE, Rubin DL, Shafa F, Stuart JM and Altman RB. Integrating genotype and phenotype information: an overview of the PharmGKB project. *Pharmacogenetics Research Network and Knowledge Base. Pharmacogenomics J* 2001; 1: 167-170.
- [47] Harris JW, Rahman A, Kim BR, Guengerich FP and Collins JM. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 1994; 54: 4026-4035.
- [48] Kim H, Kang HJ, Kim HJ, Jang MK, Kim NH, Oh Y, Han BD, Choi JY, Kim CW, Lee JW, Park KD, Shin HY and Ahn HS. Pharmacogenetic Analysis of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Possible Association between Survival Rate and ITPA Polymorphism. *PLoS One* 2012; 7: e45558.
- [49] Walko CM, Combest AJ, Spasojevic I, Yu AY, Bhushan S, Hull JH, Hoskins J, Armstrong D, Carey L, Collicio F and Dees EC. The effect of aprepitant and race on the pharmacokinetics of cyclophosphamide in breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69: 1189-1196.
- [50] Gor PP, Su HI, Gray RJ, Gimotty PA, Horn M, Aplenc R, Vaughan WP, Tallman MS, Rebbeck TR and DeMichele A. Cyclophosphamide-metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R26.
- [51] Ociepa-Zawal M, Rubis B, Filas V, Breborowicz J and Trzeciak WH. Studies on CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A4 gene polymorphisms in breast cancer patients. *Ginekol Pol* 2009; 80: 819-823.
- [52] Kurman RJ and Shih Ie M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27: 151-160.
- [53] Downie D, McFadyen MC, Rooney PH, Cruickshank ME, Parkin DE, Miller ID, Telfer C, Melvin WT and Murray GI. Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7369-7375.
- [54] Cadron I, Abdulkadir L, Despierre E, Berteloot P, Neven P, Leunen K, Amant F and Vergote I. The "Leuven" paclitaxel/carboplatin weekly regimen in patients with recurrent ovarian cancer, a retrospective study. *Gynecol Oncol* 2013; 128: 34-37.
- [55] Wu CH, Yang CH, Lee JN, Hsu SC and Tsai EM. Weekly and monthly regimens of paclitaxel and carboplatin in the management of advanced ovarian cancer. A preliminary report on side effects. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 295-299.

- [56] Havrilesky LJ, Alvarez AA, Sayer RA, Lancaster JM, Soper JT, Berchuck A, Clarke-Pearson DL, Rodriguez GC and Carney ME. Weekly low-dose carboplatin and paclitaxel in the treatment of recurrent ovarian and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 88: 51-57.
- [57] Watanabe Y, Nakai H, Ueda H and Hoshiai H. Evaluation of weekly low-dose paclitaxel and carboplatin treatment for patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 323-329.
- [58] Sharma R, Graham J, Mitchell H, Brooks A, Blagden S and Gabra H. Extended weekly dose-dense paclitaxel/carboplatin is feasible and active in heavily pre-treated platinum-resistant recurrent ovarian cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 707-712.
- [59] Leiser AL, Maluf FC, Chi DS, Sabbatini P, Hensley ML, Schwartz L, Venkatraman E, Spriggs D and Aghajanian C. A phase I study evaluating the safety and pharmacokinetics of weekly paclitaxel and carboplatin in relapsed ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 379-386.
- [60] Taniguchi R, Kumai T, Matsumoto N, Watanabe M, Kamio K, Suzuki S and Kobayashi S. Utilization of human liver microsomes to explain individual differences in paclitaxel metabolism by CYP2C8 and CYP3A4. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 83-90.
- [61] Henningsson A, Marsh S, Loos WJ, Karlsson MO, Garsa A, Mross K, Mielke S, Vigano L, Locatelli A, Verweij J, Sparreboom A and McLeod HL. Association of CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 polymorphisms with the pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8097-8104.
- [62] Fransson MN, Green H, Litton JE and Friberg LE. Influence of Cremophor EL and genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of paclitaxel and its metabolites using a mechanism-based model. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 247-255.





## **CAPÍTULO V**



## 5.1. Ovarian cancer and DNA repair: DNA ligase IV as a potential key

**Running title:** LIG4 role in ovarian cancer

Joana Assis, **Deolinda Pereira**, Rui Medeiros

**Joana Assis, Rui Medeiros**, Molecular Oncology GRP-CI, Portuguese Institute of Oncology, 4200-072 Porto, Portugal and Research Department of Portuguese League against Cancer (NRNorte), 4200-072 Porto, Portugal

**Deolinda Pereira**, Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, 4200-072 Porto, Portugal

**Deolinda Pereira, Rui Medeiros**, ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, 4200-072 Porto, Portugal

**Rui Medeiros**, CEBIMED, Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, 4200-150 Porto, Portugal

**Author contributions:** Assis J and Medeiros R designed the structure of the review; Assis J wrote the initial draft and the final version of the manuscript; Pereira D and Medeiros R critically revised the manuscript for important intellectual content; Medeiros R supervised the study and approved the version to be published.

**Supported by** Research Department of Portuguese League against Cancer (NRNorte) and Minister of Health of Portugal (CFICS-45/2007)

**Correspondence to:** **Rui Medeiros, Professor**, Molecular Oncology GRP-CI, Portuguese Institute of Oncology, R. Dr António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal. ruimedei@ipporto.min-saude.pt

**Telephone:** +351-22-5084000 **Fax:** +351-22-5084001

## Abstract

Ovarian cancer (OC) is the sixth most common cancer and the seventh cause of death from cancer in women. The etiology and the ovarian carcinogenesis still need clarification although ovulation may be determinant due to its carcinogenic role in ovarian surface epithelium. The link between ovarian carcinogenesis and DNA repair is well established and it became clear that alterations in DNA damage response may affect the risk to develop OC. Polymorphisms are variations in the DNA sequence that exist in normal individuals of a population and are capable to change, among other mechanisms, the balance between DNA damage and cellular response. Consequently, genetic variability of the host has a great role in the development, progression and consequent prognosis of the oncologic patient as well as in treatment response. Standard treatment for OC patients is based on cytoreductive surgery, followed by chemotherapy with a platinum agent and a taxane. Although 80% of the patients respond to the first-line therapy, the development of resistance is common although the mechanisms underlying therapy failure remain mostly unknown. Because of their role in oncology, enzymes involved in the DNA repair pathways, like DNA Ligase IV (LIG4), became attractive study targets. It has been reported that variations in LIG4 activity can lead to a hyper-sensitivity to DNA damage, deregulation of repair and apoptosis mechanisms, affecting the susceptibility to cancer development and therapy response. To overcome resistance mechanisms, several investigations have been made and the strategy to target crucial molecular pathways, such as DNA repair, became one of the important areas in clinical oncology. This review aims to elucidate the link between DNA repair and OC, namely which concerns the role of LIG4 enzyme, and how genetic polymorphisms in *LIG4* gene can modulate the activity of the enzyme and affect the ovarian carcinogenesis and treatment response. Moreover, we try to understand how LIG4 inhibition can be a potential contributor for the development of new cancer treatment strategies.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key words:** Ovarian Cancer; DNA Repair; DNA Ligase IV; Polymorphisms; Susceptibility; Treatment Response

Assis J, Pereira D, Medeiros R. Ovarian cancer and DNA repair: DNA ligase IV as a potential key

## INTRODUCTION

Ovarian cancer (OC) is the third most common gynecological cancer among women worldwide, with an estimate 225 000 new cases and 140 000 deaths due to this disease each year<sup>[1]</sup>. In Europe, ovarian cancer is the fifth most incident cancer in women but the main cause of death among the gynecological tumors<sup>[2]</sup>.

OC presents itself as a high heterogeneous disease, which may develop from three different cell types: epithelial cells, sex cord-stromal cells or germ cells. In spite of the fact that the ovarian epithelial layer only represents a small percentage of all ovarian cell types, epithelial ovarian carcinoma (EOC) comprises 85% to 90% of all malignant ovarian tumors in adult women<sup>[3-5]</sup>.

One of the most interesting aspects about EOC is the fact that while the transformation processes occur, the ovarian epithelium becomes more differentiated with the capability to undergo metaplasia into Müllerian epithelium. This aberrant transformation occurs in the majority of EOC and allows its histological classification into four main sub-types: serous, mucinous, endometrioid and clear cell tumors according to their histological and secretory resemblance with fallopian tube, endometrium, endocervix or vagina, respectively<sup>[6-8]</sup>.

EOC incidence is age related and is a characteristic of postmenopausal women. The majority of cases happen in women after age 40, with a median age of diagnosis of 63 years<sup>[4, 9]</sup>. By the lack of adequate experimental models to the study of this neoplasm, the etiology and the ovarian carcinogenesis still need clarification although some reproductive and hormonal events can be determinant. In this way, there have been made some possible hypothesis, which based on epidemiological and biological observations, pretend to explain susceptibility to OC<sup>[8]</sup> (Table 1). However, one of the more important risk factors established to OC is family history. About 5% to 10% of all OC are attributed to inherited mutations in high penetrance genes associated with hereditary breast and ovarian cancer, as in *BRCA1* (3%-6%) and *BRCA2* (1%-3%), and with Lynch Syndrome, generally attributed to *MLH1* and *MSH2* (1%-2%) gene mutations<sup>[10]</sup>.

EOCs are themselves a heterogeneous group of tumors. Kurman and Shih proposed an EOC sub-classification according to its clinic behavior, tumor progression, morphologic and genetic features<sup>[11, 12]</sup>. In this way, EOCs are divided in two main groups named Type I (25% of all cases), considered as lower grade, and Type II (75% of all cases), considered as higher grade. Type I tumors include all major sub-types but exhibit low-grade nuclear and architectural features, slow growth and can

be linked to well-defined benign ovarian precursor lesions. These tumors are characterized by a relative genetic stability, although mutations in *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* and *β-Catenin* genes are common, and frequently associated with a worse therapy response. On the other hand, Type II ovarian tumors are infrequently associated with benign or borderline ovarian precursor lesions, arising in an aggressive and spontaneous manner, being usually sensitive to chemotherapy. They are comprised almost exclusively of high-grade serous carcinomas (90%) but also include two less common subtypes (mixed epithelial and undifferentiated carcinomas) and those associated with *BRCA1* and *BRCA2* hereditary tumors. Type II ovarian tumors are characterized by genetic instability being usual mutations in *TP53* gene (50%-80%) and also amplification and overexpression of *HER2/neu* (10%-20%) and *AKT2* (12%-18%) oncogenes<sup>[11, 12]</sup>. This sub-classification of EOC can be the result of two divergent pathways in ovarian carcinogenesis although more studies need to be done to confirm this suggestion<sup>[13]</sup>.

As mentioned above, OC is considered the most lethal gynecological cancer<sup>[2]</sup>. This high mortality is due, essentially, to late diagnosis since, in 75% of OC cases, it is only made in an advanced disease stage, when the tumor is no longer confined to ovary<sup>[14]</sup>. In spite of diagnosis and prevention strategies improvement, some barriers to early OC detection exist and are due to its low incidence, hidden location of ovaries, not existence of well defined pre-invasive lesions and for being usually asymptomatic<sup>[15]</sup>.

Despite the high degree of phenotypic and genotypic variability between the sub-types of EOC, all patients are treated identically upon diagnosis<sup>[13]</sup>. Standard treatment for OC patients is based on cytoreductive surgery, followed by chemotherapy with a platinum agent (carboplatin or cisplatin) and a taxane (paclitaxel or docetaxel). Although 80% of the patients respond to the first-line therapy, the development of resistance is common and several patients eventually recur with a 5-year survival rate only around 45%<sup>[16-18]</sup>.

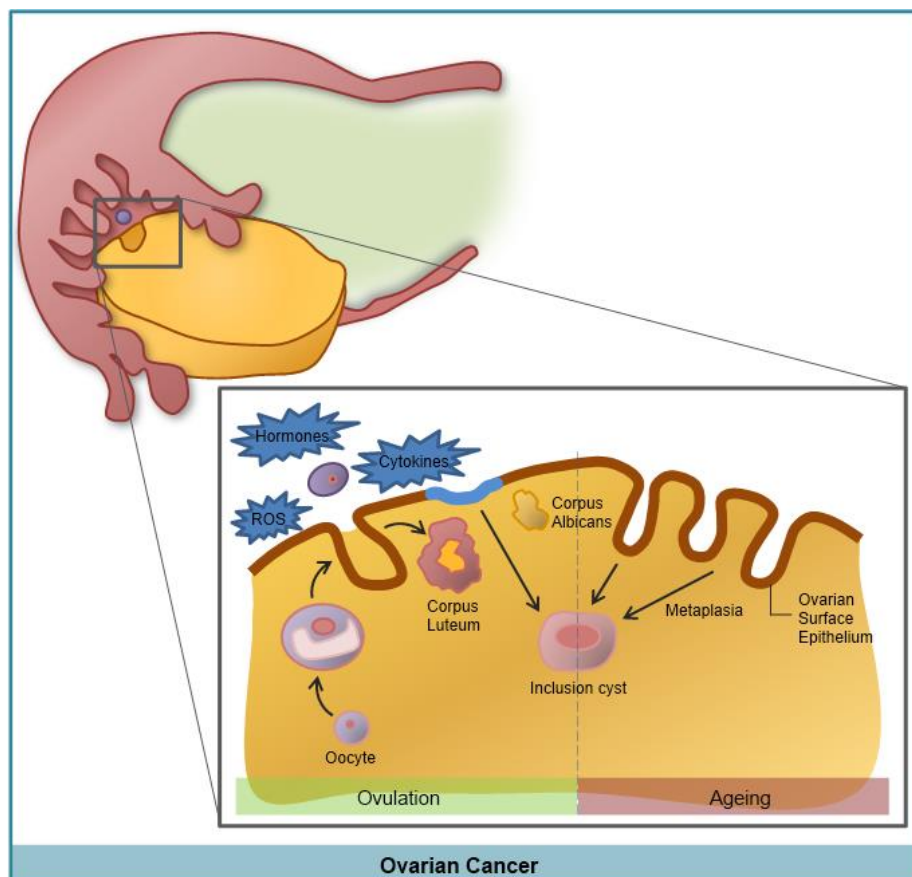
Over the past several decades, great advances have been made in surgical techniques and chemotherapy regimens used to treat OC. However, despite the best achievements between clinic and research, these strategies have not yet been shown to have an impact on overall mortality from advanced-stage disease, which 5-year survival rate has improved only 8% in the last 30 years and remain mostly unknown the mechanisms underlying therapy failure<sup>[16, 18]</sup>.

Efforts to improve long-term results of first-line therapy through addition of a third cytotoxic agent have not been successful. An improvement in the understanding

of OC biology has led to the identification of molecular targets and biological agents that interfere with DNA repair, growth factors, membrane-bound receptors and tumor-associated angiogenesis<sup>[18-20]</sup>. Emerging data regarding inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis and inhibition of poly[adenosine diphosphate (ADP)-ribose] polymerase (PARP)-mediated DNA repair are promising<sup>[18, 21, 22]</sup>.

## OVARIAN CANCER AND DNA REPAIR

The traditional view of OC asserts that the majority of OC share a common origin within ovarian surface epithelium (OSE). OSE is a monolayer of uncommitted mesothelial cells that cover the exterior surface of the ovary<sup>[7]</sup>. During the monthly ovulation, the OSE is enzymatically degraded in order to allow the follicular rupture and oocyte release, creating a breach that must be posteriorly repaired (Figure 1)<sup>[7, 23, 24]</sup>.



**Figure 1** Link between ovulation/ageing and ovarian cancer development. (Adapted from Levanon *et al*<sup>[3]</sup>)

Over the course of a woman's reproductive life, this process of damage and repair is repeated multiple times and may result in a stepwise accumulation of genomic alterations, as postulated by the incessant ovulation hypothesis (Table 1)<sup>[24]</sup>. In addition to physical trauma, OSE cells are subjected to ovulation-associated inflammatory cytokines, reactive oxygen species (ROS), and hormones (and its reactive metabolites) that are capable to damage DNA and conduct to a hormonal metabolism imbalance<sup>[3, 19, 23, 25]</sup>.

**Table 1** Hypothesis to epithelial ovarian cancer development

<b>Hypothesis</b>	<b>Biological mechanism proposed</b>	<b>Epidemiological evidence</b>
<b>Incessant ovulation</b> <sup>[24]</sup>	Repetitive ovulation and quickly cellular proliferation in post-ovulation repair creates a propitious environment to carcinogenesis initiation by genetic alteration accumulation as well as inclusion cysts development. Ovulation inhibition results in gonadotropin and oxidative stress levels reduction, deceleration of ovarian follicle depletion and to a diminished inclusion cysts development in ovarian epithelium.	Events that suppress ovulation such as pregnancy, lactation and oral contraceptive use are protective factors.
<b>Gonadotropins</b> <sup>[91]</sup>	Excessive stimulation of ovarian epithelium by FSH and LH conducts to downstream genes activation as well as to stimulation of hormonal production by the ovary (as estrogen) in order to enhance cellular proliferation and consequently to malignant transformation and angiogenesis. The formation of a protective progestagenic hormonal milieu can stimulate apoptosis in genetically damaged ovarian epithelial cells, preventing tumor development.	Oral contraceptive use and pregnancy are protective. Hyper-gonadotropic conditions are common in infertile, in polycystic ovarian syndrome and in post-menopausal women.
<b>Hormonal stimulation</b> <sup>[92]</sup>	High androgen levels are harmful while an increase in progesterone levels is benefic.	Protective effect due to multiparity and oral contraceptive use. Harmful effect is associated with higher androgen levels as in polycystic ovarian syndrome women.
<b>Inflammation</b> <sup>[25]</sup>	Ovulation is accomplished by an inflammatory response: redox potential alteration, cellular infiltration, cytokine release that can introduce DNA damage in epithelial cells involved in ovary rupture/repair	Inflammatory gynecological diseases, as endometriosis, can enhance EOC risk. Non-steroid anti-inflammatory drugs can be a protective factor.



Ovarian epithelial inclusion cysts may develop as an ovulation result or due to ageing, becoming entrapped within the stroma (Figure 1). Once inside the ovary, epithelial cells lining the inclusion cysts are exposed to an environment of aberrant autocrine/paracrine stimulation by growth factors including hormones, phospholipids and VEGF<sup>[7, 19, 26]</sup>. If the epithelial cells harbor unrepaired DNA damage, they may be prime targets for neoplastic transformation<sup>[13]</sup>.

As the link between DNA damage and ovarian carcinogenesis becomes stronger, it will become more important to completely understand the role of DNA damage response (DDR) proteins in ovarian cancer prevention. Because defects in DNA repair genes involved in DSBs repair, such as *BRCA1* and *BRCA2*, are implicated in familiar OC, overall DNA repair capacity may have an effect on the risk of sporadic ovarian cancer as well<sup>[27]</sup>.

With the human genome sequencing, the identification of genetic variations and the understanding of how common variations can affect normal cellular processes has become possible<sup>[28]</sup>. Genetic polymorphisms are naturally occurring sequence variations, about 90% of which are single nucleotide polymorphism (SNP)<sup>[29]</sup>. SNPs are single base pair positions in genomic DNA at which different alleles exist in normal individuals in some population(s), wherein the least frequent allele has an abundance of 1% or greater<sup>[30]</sup>. SNPs occur every 100-300 bases along the human genome and several studies suggest that the risk to many complex diseases, like cancer, can be extensively affected by the individual's SNP profile. Presumably, it will be the combination between the SNP profile and environmental factors that contribute to sporadic cancer development<sup>[30-32]</sup>. Genetic polymorphisms in DNA repair genes seem to determine the overall DNA repair capacity, which in turn may affect the risk of OC<sup>[15]</sup>.

DDR pathways induce cell cycle arrest in response to DNA damage, in order to maintain genomic stability. In this way, these mechanisms are known to act as tumor suppressors and proteins involved in repair pathways are considered as genome caretakers. DDR pathways are controlled by specific sets of genes and although they are considered as good players in the cancer prevention, they can act as bad players in the treatment response<sup>[27, 33]</sup>. The recognition of DNA damage and the consequent repair mechanism are crucial to the sensibility or resistance of cancer cells to treatment. This means that cells with proper DDR pathways are capable to efficiently repair the damage caused by chemo or radiotherapy, being responsible for the development of resistance in tumor cells<sup>[34]</sup>.

Pharmacogenetics and pharmacogenomics are emerging areas that are essential to the development of personalized medicine, ultimately leading to drug

prescription based on patient's individual genetic and molecular profile<sup>[30-32, 35]</sup>. The aim of these areas is to establish a relationship between the genotype (i.e. polymorphisms or mutations), gene expression profile and phenotype (both in drugs' pharmacokinetic and pharmacodynamics), interpreted as the variability between individuals concerning the toxicity, effectiveness and therapy outcome<sup>[35-39]</sup>. Polymorphisms in genes involved in DNA repair could result in variations in efficacy and accuracy of DNA repair enzymes and consequently significantly affect the toxicity, effectiveness and therapy outcome. By their role in therapy response, genetic polymorphisms in these genes can influence the patient's survival and be useful as prognostic and predictive markers in cancer<sup>[40-43]</sup>.

Moreover, with the development of DDR protein inhibitors for cancer treatment, research on targeting molecular pathways, such as DNA repair, is becoming one of the most important areas in clinical oncology<sup>[43-48]</sup>. One of the enzymes involved in DDR is DNA Ligase IV (LIG4) enzyme, which is essential to catalyze the DNA phosphodiester bond formation, in the last step of one of the DNA repair mechanisms<sup>[49]</sup>. In this review, we explore the role of LIG4 in DDR, namely in ovarian cancer carcinogenesis and treatment, as well as in the potential contribution to the development of new target therapies.

## **DNA DAMAGE RESPONSE**

Along the cell cycle and during the lifetime of a cell, the genome is continuously exposed to a wide variety of agents and processes capable to damage the DNA<sup>[50]</sup>. Therefore, genetic stability is necessary and is maintained not only by precise replication mechanisms but also by accurate and redundant systems that detect and repair possible DNA lesions. Most of DNA injuries are transitory because after its recognition, a coordinated cellular response takes place in order to interrupt the cell cycle (allowing the repair) or to lead to cell death (if the damage is too serious), maintaining genomic stability<sup>[46, 51]</sup>.

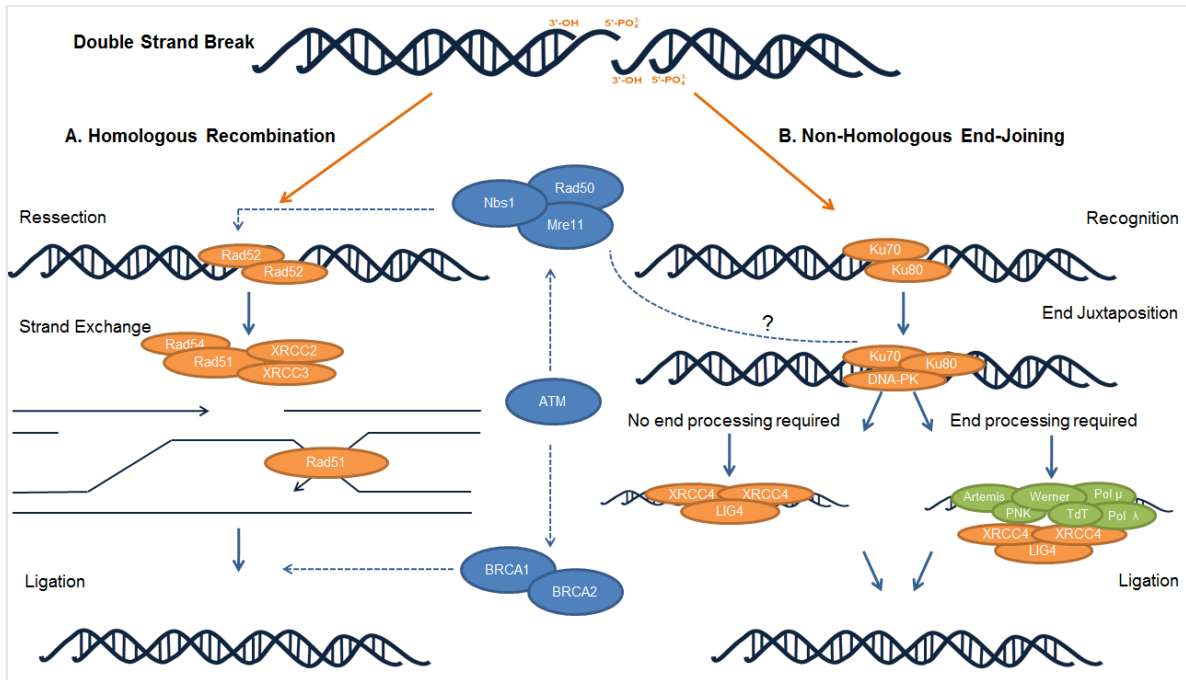
There are several DNA repair mechanisms that use different enzymes to repair different kinds of damages<sup>[34]</sup>. One of the most deleterious DNA lesions is DNA double-strand breaks (DSBs). DSBs occur when the phosphodiester backbones of both strands are simultaneously broken and close enough to disrupt base pairing, whereas chromatin structure can not keep the ends juxtaposed<sup>[50, 52]</sup>. The result is the release of two DNA ends that can get physically separated from each other, embarrassing the

subsequent repair and providing an opportunity to inappropriate recombination<sup>[50]</sup>. These breaks can arise in all phases of the cell cycle from a wide range of agents and processes: as result of normal cellular metabolism, by the action of ROS, or as result of physiological processes like V(D)J recombination, DNA replication or meiosis. Exogenous factors can include ionizing radiation (IR) as well as chemotherapeutic agents<sup>[52-54]</sup>.

In eukaryotic cells, DSBs can be repaired by two main pathways: Homologous Recombination (HR) and Non-Homologous End-Joining (NHEJ)<sup>[34, 50, 52]</sup> (Figure 2).

In HR pathway, the break is repaired using the homologous chromosome or sister chromatid as template. This is considered an accurate repair pathway and it is thought that could be particularly important for DSB repair in S/G2 phases of the cell cycle, where replicated sequences are available to serve as repair templates<sup>[34, 50, 55]</sup>. In NHEJ pathway, the broken strands are crudely joined together at a site of micro-homology, frequently resulting in small alterations at the site of fusion, being often described as error-prone. Although been able to operate throughout cell cycle, NHEJ is the predominant pathway during G0, G1 and early S phases of the cell cycle<sup>[27, 34, 55-60]</sup>.

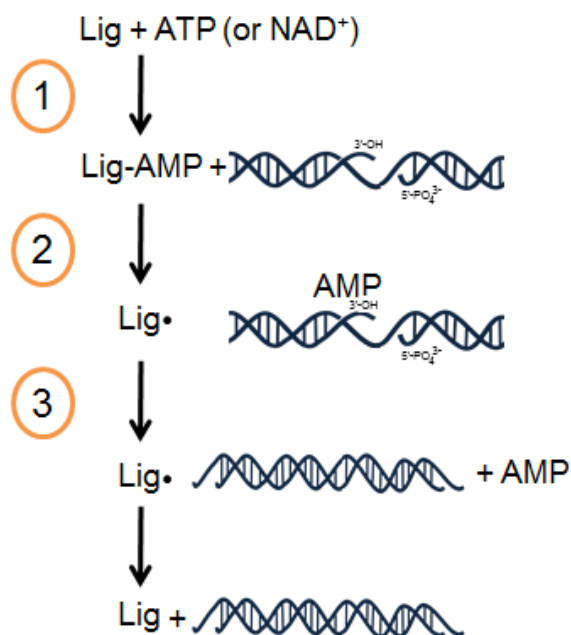
NHEJ and HR proteins are highly conserved across all eukaryotes and ubiquitously expressed in multi-cellular organisms. HR appears to be the predominant DSB repair pathway in yeast although NHEJ is the main pathway in higher organisms such as mammals<sup>[50, 52]</sup>. However, recent evidence suggests that these major repair pathways can cooperate and compete with each other at DSBs to promote efficient repair and genomic integrity<sup>[61]</sup>.



**Figure 2** Simplified overview of homologous recombination and non-homologous end-joining. Homologous recombination (HR) pathway starts with break recognition and signaling by a complex containing NBS1, MRE11 and RAD50 (MRE11/RAD50/NBS1 - MRN complex). RAD51 and RAD52 catalyze and facilitate a strand exchange reaction. Assembly of RAD51 is facilitated by different RAD51 paralogs such XRCC2 and XRCC3. MRN complex also promotes activation of ATM, which in turn activates several DNA repair factors as BRCA1/2. HR finishes with DNA synthesis and final ligation. Non-homologous end-joining (NHEJ) pathway starts with the recruitment of Ku heterodimer (Ku70 and Ku80) to DNA ends. Once attached to double-strand breaks, Ku recruits and stimulates the DNA-PKcs, forming the DNA-PK holoenzyme. DNA-PK activates XRCC4-LIG4 complex, which links the broken complementary DNA ends together. If DNA ends are not ready to end joining, it is necessary a previous DNA end processing, which may involve numerous enzymes as Artemis, Werner, DNA Polimerases  $\mu$  e  $\lambda$ , Polynucleotide kinase (PNK) and Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)), to conclude the NHEJ pathway. The role of MRN complex in NHEJ pathway it is still not clear.

## LIGASE IV ENZYME AND ITS ROLE IN ONCOLOGY

DNA ligase enzymes are an evolutionary related protein family, involved in innumerous cellular processes such as DNA replication, genetic recombination and DNA repair. They are nucleotidyltransferase enzymes (NTases) that use an energetic source to catalyze phosphodiester bond formation in a three-step reaction mechanism<sup>[49, 62, 63]</sup> (Figure 3).



**Figure 3** Enzymatic ligation of DNA by DNA ligase. The three-step reaction results in the sequential transfer of AMP (adenosine 5'-monophosphate) to an active-site lysine in Lig enzyme (step 1) then to DNA end (step 2), which results in the formation of a phosphodiester bond and consequently to a ligated DNA product (step 3). Lig: Ligase. (Adapted from Ellenberger et al[49])

The ligation reaction has a high energetically yield, in which an adenylate group (adenosine 5'-monophosphate - AMP) is sequentially transferred from ATP or NAD<sup>+</sup> to a highly conserved lysine residue in the active site of the DNA ligase enzyme (Step 1), with the formation of a covalent enzyme-adenylate intermediate. This first step occurs independently of DNA whereas the subsequent steps involve interaction between the DNA ligase and its DNA substrat. Formerly, the AMP is transferred to the 5'-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> DNA end to generate a covalent DNA-adenylate intermediate (Step 2). In the final step, the non-adenylated DNA Ligase catalyzes the formation of a phosphodiester bond, in a reaction that involves a nucleophilic attack by a 3'-OH on the 5' end of the DNA adenylate and the release of AMP (Step 3)<sup>[49, 62]</sup>. By the high favorable reaction equilibrium, each chemical step makes this reaction sequence effectively irreversible, proving once again the importance of DNA repair<sup>[49]</sup>.

DNA ligases have the capability to change their conformation during the DNA joining reaction in order to accommodate the multiple reactions that catalyze. These enzymes have multiple domains that provide the necessary flexibility to completely encircle their DNA substrates as well as the capacity to open and close around DNA<sup>[49]</sup>.

In the human genome there are three genes that codify four DNA Ligases: *LIG1*, *LIG3* and *LIG4*, with the DNA Ligases II and III being expressed by alternative splicing of mRNA from *LIG3*<sup>[49, 64]</sup>. Consistent with the common evolution, all of the eukaryotic

enzymes are ATP-dependent and are related in terms of sequence and structure<sup>[49, 62, 63]</sup>.

*LIG4* gene, located in 13q33 chromosome, codify an exclusively nuclear protein, with approximately 100 kDa, which shares homology with the other ligases in N-terminal region but not in the C-terminal region<sup>[62, 65]</sup>. Its catalytic domain (CD) comprises six conserved sequence motifs (I, III, III $\alpha$ , IV, V, VI) that define the nucleotidyltransferase family. Motif I includes the lysine residue that is adenylated in the first step of the ligation reaction. The non-catalytic domain (NCD), which is poorly conserved between the different family members, does not have a known function yet<sup>[63, 64]</sup>.

LIG4 enzyme is characterized by a C-terminal extension that includes two tandem copies of the BRCT homology domain, which are found in other DNA repair and checkpoint-associated proteins<sup>[65-67]</sup>. These motifs are separated by a short linker sequence that contains a conserved binding site presumably necessary to the interaction with XRCC4 in NHEJ pathway<sup>[68-70]</sup>. XRCC4 is responsible for the stabilization and stimulation of the ligase activity by LIG4, such as adenylation, as well as to protect LIG4 from degradation<sup>[68, 71]</sup>. Furthermore, the stability of LIG4 is also regulated by phosphorylation at a serine residue (Ser650)<sup>[49]</sup>. Structural studies suggest that in the XRCC4-LIG4 complex, the stoichiometric proportion is one molecule of LIG4 to two molecules of XRCC4<sup>[70, 72]</sup>.

Despite the fact of being essential in the DSB repair, the XRCC4-LIG4 complex is DNA-PK dependent and because of that is an exclusive complex of the NHEJ pathway. However, LIG4 appears to function in specialized cells of the immune system where it also completes V(D)J recombination<sup>[69]</sup>.

Under normal conditions, the human genome is replicated and stabilized by highly accurate complex replication and repair machinery. The increased incidence of certain pathologies, like cancer, associated with DNA repair-deficient human syndromes, illustrates the crucial role of these pathways in protection against genomic instability<sup>[73]</sup>. The LIG4 importance in the maintenance of genomic stability appears to be associated with the fact that mutations in this gene are associated with a rare autosomal syndrome (OMIM 606593) characterized by microcephaly, several immunodeficiency, spontaneous genomic instability and a higher susceptibility to complex diseases such as cancer<sup>[50, 60, 74, 75]</sup>. Cells from LIG4 patients display increased radiosensitivity and are defective in NHEJ DSB repair<sup>[60, 75, 76]</sup>. Knocking out DNA Ligase IV in mice results in late embryonic lethality with massive neuronal apoptosis and lymphocyte development arrest due to lack of V(D)J recombination<sup>[77, 78]</sup>.

To date, several polymorphisms have been identified in *LIG4* gene, some of them potentially capable to modulate *LIG4* activity. For example, *LIG4* polymorphism rs1805388 C/T was found in N-terminal region and has been linked with a reduced adenylation and ligation activities of the enzyme<sup>[79]</sup>. Variations in enzymatic activity of *LIG4* can conduct to a hyper-sensitivity to DNA damage, deregulation of repair and apoptosis mechanisms, affecting the susceptibility to cancer development as well as oncologic therapy response. The principal studies that have been developed to understand the *LIG4* polymorphisms role in cancer are described in Table 2.

Radiotherapy and chemotherapy remain the core of conventional cancer treatment and it is necessary to understand how cells respond to DNA damage and determine whether DDR could be exploited or manipulated for therapeutic purposes. There is a growing interest in the identification of DNA repair inhibitors that will enhance the cytotoxicity of DNA damaging agents that, when used concomitantly, may have the capacity to increase the response to treatment<sup>[46, 48]</sup>.

Since DNA ligation is an ubiquitous stage in the majority of cellular processes and the last step of almost all DNA repair pathways, DNA ligases are attractive therapeutic targets since it is expected that cells defective in DSB repair will be more sensitive to chemotherapeutic agents<sup>[44, 46, 49]</sup>.

Some studies suggest that *LIG4* down-regulation could be a potential strategy to enhance the therapeutic effects of chemotherapy<sup>[44-46]</sup>. Kondo and collaborators designed a study to better understand the role of DSB repair pathways, including NHEJ, on cellular sensitivity to Temozolomide (TMZ) in glioblastoma<sup>[45]</sup>. First, they evaluated the role of repair genes in the presence of TMZ-induced DNA damage. Within the cell lines evaluated, *LIG4* *-/-* cells were the most sensitive to TMZ action. To test whether this result was pertinent to chemotherapy used against glioblastoma, *LIG4* expression was silenced in A172 glioblastoma cells using siRNA. Results showed that *LIG4* silencing increased cellular sensitivity to TMZ approximately three times. Therefore, the authors proposed that *LIG4* down regulation can potentially be a useful strategy for enhance the therapeutic effects of TMZ, becoming *LIG4* a new molecular target for chemotherapy<sup>[45]</sup>. In a study designed by Friesen and collaborators, they investigated the role of *LIG4* in deficient caspases activation by doxorubicin<sup>[80]</sup>. The results showed that doxorubicin strongly induced apoptosis and caspases activation in *LIG4* defective cells suggesting that *LIG4*, as a key enzyme for NHEJ repair, also plays an important role in deficient caspases activation in cancer cells<sup>[80]</sup>.

In a last view, it may be useful the combination between *LIG4* inhibitors with the individual's *LIG4* profile since observations suggest that in a partially defective

genetic background, additional reduction in ligase levels additionally compromises the cellular ability to repair DSBs<sup>[81]</sup>.

## LIGASE IV IN OVARIAN CANCER

In which concerns to *LIG4* polymorphisms and their role in OC risk just a few studies have been made<sup>[82-84]</sup> (Table 2). Due to contradictory results obtained to some polymorphisms and OC risk, Ovarian Cancer Association Consortium (OCAC) has been formed with the purpose to evaluate the evidence for association in SNPs, which had already been genotyped by multiple studies by combining the existing data. This collaboration has shown that 1977 T/C polymorphism in *LIG4* gene (rs1805386) was not associated with OC risk, although the initial results proposed a significantly positive association<sup>[83]</sup>.

OC remains a treatment challenge. Although the initial response of the OC patients to chemotherapy is good, many patients recur and develop, possibly, cell clones resistant to therapy. Platinum analogs, as cisplatin or carboplatin, are one of the most widely used anti-cancer drugs due to its broad-spectrum of activity against human tumors, namely ovarian cancer. Platinum compounds react with DNA molecules, forming inter and intrastrand DNA crosslinks, and consequently blocking the movement of DNA replication and transcription machinery along DNA, which results in the arrest of the cell cycle and the activation of DNA repair pathways<sup>[85-88]</sup>. Nucleotide excision repair (NER) is the main mechanism responsible for platinum-DNA adducts removal although some studies proposed that these adducts can inhibit NHEJ repair pathway and consequently influence the patient's overall survival since survival is longer in patients with higher levels of platinum-DNA adducts<sup>[18, 52, 89]</sup>. Clinical use of platinum compounds in OC treatment is conditioned by the development of resistance which can result from reduced intracellular accumulation, increased drug inactivation, increased repair of damaged DNA, increased activation of pro-survival pathways or inhibition of pathways that promote cell death<sup>[90]</sup>. Besides the importance of NHEJ, and specifically of *LIG4*, to platinum treatment response, to the best of our knowledge no study evaluated the association between *LIG4* polymorphisms and the chemotherapy response of OC patients. It would be interesting to evaluate the role of *LIG4* polymorphisms in platinum resistance and relate them to *LIG4* mRNA expression in order to predict the clinical outcome of OC patients and possibly use this marker to guide chemotherapy selection in woman with OC.



Following the PARP inhibitors treatment applicability, LIG4 inhibitors may be concomitantly used with standard therapy for OC treatment in order to enhance its effect and to exploit intrinsic defects in specific DNA repair pathway. This approach might create a large therapeutic window and help to overcome chemotherapy failure in OC treatment. Potential strategies to inhibit the LIG4 action can be by the use of siRNA, as mentioned by Kondo *et al*<sup>[45]</sup>, or by the use of small molecules in silico designed, as mentioned by Chen and collaborators<sup>[46]</sup>.

**Table 2** Some studies that evaluate *LIG4* polymorphisms role in cancer

Authors	LIG4 SNP identification	Tumor Model	Ethnicity	Result
Jakubowska <i>et al</i> <sup>[84]</sup>	rs1805386	Ovarian and Breast Cancer	Caucasian	The polymorphism was not associated with BRCA1-associated ovarian and breast cancer risk ( $P = 0.16$ and $P = 0.97$ , respectively)
Schildkraut <i>et al</i> <sup>[82]</sup>	rs10131	Ovarian Cancer	Caucasian	The polymorphism was significantly associated with invasive serous ovarian cancer risk ( $P < 0.05$ )
Pearce <i>et al</i> <sup>[83]</sup>	rs1805386	Ovarian Cancer	Mixed	The polymorphism was initially associated with ovarian cancer risk ( $P = 0.007$ ) but replication results do not confirm this association
Yin <i>et al</i> <sup>[93]</sup>	rs1805388	Non-small cell Lung Cancer	Mixed	The polymorphism was significantly associated with the risk of severe radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients who received radio(chemo)therapy ( $P < 0.05$ )
Tseng <i>et al</i> <sup>[94]</sup>	rs1805388	Non-small cell Lung Cancer	Asian	The polymorphism was significantly associated with lung cancer risk ( $P = 0.038$ ) especially in smoking patients ( $P = 0.015$ ), and with high fractional allelic loss ( $P = 0.016$ )
de la Penas <i>et al</i> <sup>[89]</sup>	rs1805386	Non-small cell Lung Cancer	Caucasian	The polymorphism was not associated with survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small cell lung cancer patients ( $P = 0.31$ )
Sakiyama <i>et al</i> <sup>[95]</sup>	rs2232641	Lung Cancer	Japanese	The polymorphism was significantly associated with a diminish risk to develop lung cancer ( $P = 0.03$ )
Sobczuk <i>et al</i> <sup>[96]</sup>	rs2232641	Breast Cancer	Caucasian	The polymorphism was not associated with breast cancer risk ( $P > 0.05$ )
Han <i>et al</i> <sup>[97]</sup>	rs1805386 rs4987182	Breast Cancer	Mostly Caucasian	No statistically differences in breast cancer risk according LIG4 C299T or T1977C. The polymorphism T1977C was significantly associated with breast cancer risk if the patients had a first degree family history of breast cancer ( $P = 0.01$ )
Goode <i>et al</i> <sup>[98]</sup>	rs1805386	Breast Cancer	Caucasian	The polymorphism was significantly associated with the breast cancer survival ( $P = 0.002$ )
Kuschel <i>et al</i> <sup>[99]</sup>	rs1805386	Breast Cancer	Caucasian	The polymorphism was significantly associated with a decrease in breast cancer risk ( $P = 0.04$ )
Liu <i>et al</i> <sup>[100]</sup>	rs3093739	Glioma	Asian	The polymorphism was significantly associated with glioma risk ( $P = 0.009$ )
Liu <i>et al</i> <sup>[101]</sup>	rs7325927	Glioblastoma	Caucasian	The polymorphism was significantly associated with glioblastoma survival ( $P = 0.008$ )

## CONCLUSION

Besides the strong link between DNA repair and OC, the knowledge about LIG4 role in ovarian carcinogenesis is still very limited and one of the aims of this review was to compile all the available information. In last years, translational research has reached an essential role in oncology and the identification of an individual SNP profile, which used in combination with risk factors, can lead to the establishment of potential susceptibility and prognosis factors. In this way, it became clear that the development of new studies are essential to better understand the functional role of polymorphisms in *LIG4* gene and how they can be linked to OC development, namely which concerns with repair-associated ovulation. In other perspective, the definition of a SNP profile could be a useful manner to implement screening and prevention strategies and consequently decrease the OC mortality.

To the best of our knowledge, no study has been done regarding *LIG4* polymorphisms and their influence in OC treatment response. However, in this review, we described the dual role of LIG4 enzyme in cancer. Some studies have associated high levels of this enzyme with a good response to carcinogenic damage repair and the consequent genomic stability maintenance. However, in an opposite view, high levels of LIG4 enzyme can lead to worse treatment response due to the higher capability to repair the damage induced by chemo or radiotherapy. It is known that genetic polymorphisms are capable to affect the functional activity of DNA repair enzymes and affect significantly the effectiveness and therapy outcome. Besides this aspect, studies are made in order to discover and develop new treatment strategies to overcome therapy resistance and improve OC survival rates, namely using DNA repair as treatment target. The inhibition of LIG4 can possibly be an useful strategy to overcome the chemotherapy failure associated with OC standard treatment.

## REFERENCES

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
- 2 Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765-781 [PMID: 20116997 DOI: 10.1016/j.ejca.2009.12.014]
- 3 Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5284-5293 [PMID: 18854563 DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1107]
- 4 Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*; 19: 3-10 [PMID: 10883018 DOI: 10.1002/1098-2388(200007/08)19:1<3::AID-SSU2>3.0.CO;2-S]
- 5 Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003; 97: 2631-2642 [PMID: 12733128 DOI: 10.1002/cncr.11345]
- 6 Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 415-428 [PMID: 19461667 DOI: 10.1038/nrc2644]
- 7 Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001; 22: 255-288 [PMID: 11294827]
- 8 Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 247: 4-21 [PMID: 16297528 DOI: 10.1016/j.mce.2005.09.014]
- 9 Leitao MM, Boyd J, Hummer A, Olvera N, Arroyo CD, Venkatraman E, Baergen RN, Dizon DS, Barakat RR, Soslow RA. Clinicopathologic analysis of early-stage sporadic ovarian carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 147-159 [PMID: 15043303]
- 10 Berchuck A, Schildkraut JM, Marks JR, Futreal PA. Managing hereditary ovarian cancer risk. *Cancer* 1999; 86: 2517-2524 [PMID: 10630177 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19991201)86:11]
- 11 Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1511-1518 [PMID: 15111296]
- 12 Kurman RJ, Shih IeM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27: 151-160 [PMID: 18317228 DOI: 10.1097/PGP.0b013e318161e4f5]
- 13 Karst AM, Drapkin R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *J Oncol* 2010; 2010: 932371 [PMID: 19746182 DOI: 10.1155/2010/932371]
- 14 Bhoola S, Hoskins WJ. Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 1399-1410 [PMID: 16738170 DOI: 10.1076/6/1399]

- 15 Fasching PA, Gayther S, Pearce L, Schildkraut JM, Goode E, Thiel F, Chenevix-Trench G, Chang-Claude J, Wang-Gohrke S, Ramus S, Pharoah P, Berchuck A. Role of genetic polymorphisms and ovarian cancer susceptibility. *Mol Oncol* 2009; 3: 171-181 [PMID: 19383379 DOI: 10.1016/j.molonc.2009.01.008]
- 16 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* ; 58: 71-96 [PMID: 18287387 DOI: 10.3322/CA.2007.0010]
- 17 Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, DeGeest K, Hartenbach EM, Baergen R. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3194-3200 [PMID: 12860964 DOI: 10.1200/JCO.2003.02.153]
- 18 Bookman MA. Developmental chemotherapy and management of recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 149s-167s [PMID: 17633784]
- 19 Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009; 374: 1371-1382 [PMID: 19793610 DOI: S0140-6736(09)61338-6]
- 20 Banerjee S, Gore M. The future of targeted therapies in ovarian cancer. *Oncologist* 2009; 14: 706-716 [PMID: 19592450 DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0013]
- 21 Kling J. PARP inhibitors blaze a trail in difficult-to-treat cancers. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 784-786 [PMID: 19741614 DOI: 10.1038/nbt0909-784]
- 22 Barrena Medel NI, Wright JD, Herzog TJ. Targeted therapies in epithelial ovarian cancer. *J Oncol* 2010; 2010: 314326 [PMID: 20111741 DOI: 10.1155/2010/314326]
- 23 Murdoch WJ, McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* 2002; 123: 743-750 [PMID: 12052228]
- 24 Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163 [PMID: 4104488]
- 25 Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1459-1467 [PMID: 10469746]
- 26 Smith ER, Xu XX. Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the aetiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1108-1111 [PMID: 19012860 DOI: S1470-2045(08)70281-X]
- 27 Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 1042-1048 [PMID: 16822724 DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.026]
- 28 Chakravarti A. To a future of genetic medicine. *Nature* 2001; 409: 822-823 [PMID: 11236997 DOI: 10.1038/35057281]
- 29 Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8: 1229-1231 [PMID: 9872978]

- 30 Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-186 [PMID: 10395891 DOI: S037811199900219X]
- 31 Baye TM, Wilke RA. Mapping genes that predict treatment outcome in admixed populations. *Pharmacogenomics J* 2010; 10: 465-477 [PMID: 20921971 DOI: 10.1038/tpj.2010.71]
- 32 Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348: 538-549 [PMID: 12571262 DOI: 10.1056/NEJMra020526]
- 33 Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761, 763 [PMID: 9126728 DOI: 10.1038/386761a0]
- 34 Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003; 193: 3-34 [PMID: 14599765 DOI: S0300483X03002877]
- 35 Yan L, Beckman R. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in oncology therapeutic antibody development. *Biotechniques* 2005; 39: S565-S568 [PMID: 18957038 DOI: 10.2144/000112043]
- 36 Santos AM, Sousa H, Portela C, Pereira D, Pinto D, Catarino R, Rodrigues C, Araújo AP, Lopes C, Medeiros R. TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 256-262 [PMID: 16364249 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.11.176]
- 37 Pinto D, Pereira D, Portela C, da Silva JL, Lopes C, Medeiros R. The influence of HER2 genotypes as molecular markers in ovarian cancer outcome. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 1173-1178 [PMID: 16112085 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.08.012]
- 38 Catarino R, Araújo A, Coelho A, Gomes M, Nogueira A, Lopes C, Medeiros RM. Prognostic significance of telomerase polymorphism in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3706-3712 [PMID: 20606038 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3030]
- 39 Medeiros R, Pereira D, Afonso N, Palmeira C, Faleiro C, Afonso-Lopes C, Freitas-Silva M, Vasconcelos A, Costa S, Osório T, Lopes C. Platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma: glutathione S-transferase genetic polymorphisms as predictive biomarkers of disease outcome. *Int J Clin Oncol* 2003; 8: 156-161 [PMID: 12851839 DOI: 10.1007/s10147-003-0318-8]
- 40 Nogueira A, Catarino R, Coelho A, Araújo A, Gomes M, Medeiros R. Influence of DNA repair RAD51 gene variants in overall survival of non-small cell lung cancer patients treated with first line chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 501-506 [PMID: 19960343 DOI: 10.1007/s00280-009-1187-2]
- 41 Nogueira A, Catarino R, Faustino I, Nogueira-Silva C, Figueiredo T, Lombo L, Hilário-Silva I, Pereira D, Medeiros R. Role of the RAD51 G172T polymorphism in the clinical outcome of cervical cancer patients under concomitant chemoradiotherapy. *Gene* 2012; 504: 279-283 [PMID: 22634097 DOI: 10.1016/j.gene.2012.05.037]

- 42 Silva J, Teixeira AL, Lobo F, Maurício J, Medeiros R. DNA repair system and prostate cancer progression: the role of NBS1 polymorphism (rs1805794). *DNA Cell Biol* 2012; 31: 1182-1186 [PMID: 22413803 DOI: 10.1089/dna.2011.1562]
- 43 Moeller BJ, Pasqualini R, Arap W. Targeting cancer-specific synthetic lethality in double-strand DNA break repair. *Cell Cycle* 2009; 8: 1872-1876 [PMID: 19440052]
- 44 Kondo N, Takahashi A, Mori E, Noda T, Su X, Ohnishi K, McKinnon PJ, Sakaki T, Nakase H, Ono K, Ohnishi T. DNA ligase IV is a potential molecular target in ACNU sensitivity. *Cancer Sci* 2010; 101: 1881-1885 [PMID: 20487264 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01591.x]
- 45 Kondo N, Takahashi A, Mori E, Ohnishi K, McKinnon PJ, Sakaki T, Nakase H, Ohnishi T. DNA ligase IV as a new molecular target for temozolomide. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387: 656-660 [PMID: 19615340 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.07.045]
- 46 Chen X, Zhong S, Zhu X, Dziegielewska B, Ellenberger T, Wilson GM, MacKerell AD, Tomkinson AE. Rational design of human DNA ligase inhibitors that target cellular DNA replication and repair. *Cancer Res* 2008; 68: 3169-3177 [PMID: 18451142 DOI: 68/9/3169]
- 47 Martinek I, Haldar K, Gaitskell K, Bryant A, Nicum S, Kehoe S, Morrison J. DNA-repair pathway inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; : CD007929 [PMID: 20556786 DOI: 10.1002/14651858.CD007929.pub2]
- 48 Wicki A, Rochlitz C. Targeted therapies in breast cancer. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13550 [PMID: 22544433 DOI: 10.4414/smw.2012.13550]
- 49 Ellenberger T, Tomkinson AE. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 313-338 [PMID: 18518823 DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.123941]
- 50 Bassing CH, Alt FW. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*; 3: 781-796 [PMID: 15279764 DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.06.001]
- 51 Zhang Y, Zhou J, Lim CU. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res* 2006; 16: 45-54 [PMID: 16467875 DOI: 10.1038/sj.cr.7310007]
- 52 Pastwa E, Błasiak J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 891-908 [PMID: 14739985 DOI: 035004891]
- 53 Lee Y, McKinnon PJ. DNA ligase IV suppresses medulloblastoma formation. *Cancer Res* 2002; 62: 6395-6399 [PMID: 12438222]
- 54 Costantini S, Woodbine L, Andreoli L, Jeggo PA, Vindigni A. Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6: 712-722 [PMID: 17241822 DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.12.007]
- 55 Adachi N, Ishino T, Ishii Y, Takeda S, Koyama H. DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12109-12113 [PMID: 11593023 DOI: 10.1073/pnas.201271098]

- 56 Bau DT, Fu YP, Chen ST, Cheng TC, Yu JC, Wu PE, Shen CY. Breast cancer risk and the DNA double-strand break end-joining capacity of nonhomologous end-joining genes are affected by BRCA1. *Cancer Res* 2004; 64: 5013-5019 [PMID: 15256476 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0403]
- 57 Biard DS. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 3535-3550 [PMID: 17483520 DOI: 10.1093/nar/gkm195]
- 58 Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 1998; 17: 5497-5508 [PMID: 9736627 DOI: 10.1093/emboj/17.18.5497]
- 59 Critchlow SE, Jackson SP. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 394-398 [PMID: 9810228 DOI: S0968-0004(98)01284-5]
- 60 Pollard JM, Gatti RA. Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 1323-1331 [PMID: 19616740 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.02.057]
- 61 Kass EM, Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* 2010; 584: 3703-3708 [PMID: 20691183 DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.057]
- 62 Timson DJ, Singleton MR, Wigley DB. DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutat Res* 2000; 460: 301-318 [PMID: 10946235]
- 63 Martin IV, MacNeill SA. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS3005 [PMID: 11983065]
- 64 Shuman S, Schwer B. RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Mol Microbiol* 1995; 17: 405-410 [PMID: 8559059]
- 65 Tomkinson AE, Mackey ZB. Structure and function of mammalian DNA ligases. *Mutat Res* 1998; 407: 1-9 [PMID: 9539976]
- 66 Wei YF, Robins P, Carter K, Caldecott K, Pappin DJ, Yu GL, Wang RP, Shell BK, Nash RA, Schär P. Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3206-3216 [PMID: 7760816]
- 67 Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR. Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 1997; 388: 495-498 [PMID: 9242411 DOI: 10.1038/41365]
- 68 Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 1997; 7: 588-598 [PMID: 9259561 DOI: S0960-9822(06)00258-2]



- 69 Grawunder U, Zimmer D, Lieber MR. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol* 1998; 8: 873-876 [PMID: 9705934 DOI: S0960-9822(07)00349-1]
- 70 Sibanda BL, Critchlow SE, Begun J, Pei XY, Jackson SP, Blundell TL, Pellegrini L. Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 1015-1019 [PMID: 11702069 DOI: 10.1038/nsb725]
- 71 Calsou P, Delteil C, Frit P, Drouet J, Salles B. Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J Mol Biol* 2003; 326: 93-103 [PMID: 12547193 DOI: S0022283602013281]
- 72 Modesti M, Junop MS, Ghirlando R, van de Rakt M, Gellert M, Yang W, Kanaar R. Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *J Mol Biol* 2003; 334: 215-228 [PMID: 14607114 DOI: S0022283603011847]
- 73 Heinen CD, Schmutte C, Fishel R. DNA repair and tumorigenesis: lessons from hereditary cancer syndromes. *Cancer Biol Ther* ; 1: 477-485 [PMID: 12496472]
- 74 Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol* 2008; 47: 809-824 [PMID: 18568480 DOI: 789791325]
- 75 O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 45-54 [PMID: 16369571 DOI: 10.1038/nrg1746]
- 76 Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber MR. Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *Bioessays* 2003; 25: 1061-1070 [PMID: 14579247 DOI: 10.1002/bies.10344]
- 77 Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, Lieber MR. DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell* 1998; 2: 477-484 [PMID: 9809069 DOI: S1097-2765(00)80147-1]
- 78 Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 1999; 9: 699-702 [PMID: 10395545 DOI: S0960-9822(99)80311-X]
- 79 Girard PM, Kysela B, Härer CJ, Doherty AJ, Jeggo PA. Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2369-2376 [PMID: 15333585 DOI: 10.1093/hmg/ddh274]
- 80 Friesen C, Uhl M, Pannicke U, Schwarz K, Miltner E, Debatin KM. DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 3283-3289 [PMID: 18508926 DOI: 10.1091/mbc.E08-03-0306]
- 81 Windhofer F, Wu W, Iliakis G. Low levels of DNA ligases III and IV sufficient for effective NHEJ. *J Cell Physiol* 2007; 213: 475-483 [PMID: 17492771 DOI: 10.1002/jcp.21120]

- 82 Schildkraut JM, Iversen ES, Wilson MA, Clyde MA, Moorman PG, Palmieri RT, Whitaker R, Bentley RC, Marks JR, Berchuck A. Association between DNA damage response and repair genes and risk of invasive serous ovarian cancer. *PLoS One* 2010; 5: e10061 [PMID: 20386703 DOI: 10.1371/journal.pone.0010061]
- 83 Pearce CL, Near AM, Van Den Berg DJ, Ramus SJ, Gentry-Maharaj A, Menon U, Gayther SA, Anderson AR, Edlund CK, Wu AH, Chen X, Beesley J, Webb PM, Holt SK, Chen C, Doherty JA, Rossing MA, Whittemore AS, McGuire V, DiCioccio RA, Goodman MT, Lurie G, Carney ME, Wilkens LR, Ness RB, Moysich KB, Edwards R, Jennison E, Kjaer SK, Hogdall E, Hogdall CK, Goode EL, Sellers TA, Vierkant RA, Cunningham JM, Schildkraut JM, Berchuck A, Moorman PG, Iversen ES, Cramer DW, Terry KL, Vitonis AF, Titus-Ernstoff L, Song H, Pharoah PD, Spurdle AB, Anton-Culver H, Ziogas A, Brewster W, Galitovskiy V, Chenevix-Trench G. Validating genetic risk associations for ovarian cancer through the international Ovarian Cancer Association Consortium. *Br J Cancer* 2009; 100: 412-420 [PMID: 19127255 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604820]
- 84 Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, Górski B, Huzarski T, Byrski T, Tołoczko-Grabarek A, Gilbert M, Edler L, Zapatka M, Eils R, Lubiński J, Scott RJ, Hamann U. BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks in Poland: no association with commonly studied polymorphisms. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 201-211 [PMID: 19360465 DOI: 10.1007/s10549-009-0390-5]
- 85 Trimmer EE, Essigmann JM. Cisplatin. *Essays Biochem* 1999; 34: 191-211 [PMID: 10730196]
- 86 Reed E. Cisplatin. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 1999; 18: 144-151 [PMID: 10800481]
- 87 Lawley PD, Phillips DH. DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* 1996; 355: 13-40 [PMID: 8781575]
- 88 Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1229-1235 [PMID: 11028915]
- 89 de las Peñas R, Sanchez-Ronco M, Alberola V, Taron M, Camps C, Garcia-Carbonero R, Massuti B, Queralt C, Botia M, Garcia-Gomez R, Isla D, Cobo M, Santarpia M, Cecere F, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R. Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2006; 17: 668-675 [PMID: 16407418 DOI: 10.1093/annonc/mdj135]
- 90 Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279 [PMID: 14576837 DOI: 10.1038/sj.onc.1206933]
- 91 Stadel BV. Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 123: 772-774 [PMID: 1200073]
- 92 Risch HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1774-1786 [PMID: 9839517]
- 93 Yin M, Liao Z, Liu Z, Wang LE, O'Reilly M, Gomez D, Li M, Komaki R, Wei Q. Genetic variants of the nonhomologous end joining gene LIG4 and severe radiation pneumonitis in nonsmall

cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Cancer* 2012; 118: 528-535 [PMID: 21717429 DOI: 10.1002/cncr.26214]

94 Tseng RC, Hsieh FJ, Shih CM, Hsu HS, Chen CY, Wang YC. Lung cancer susceptibility and prognosis associated with polymorphisms in the nonhomologous end-joining pathway genes: a multiple genotype-phenotype study. *Cancer* 2009; 115: 2939-2948 [PMID: 19408343 DOI: 10.1002/cncr.24327]

95 Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T, Kunitoh H, Saito R, Shimizu K, Hiramata C, Kimura J, Maeno G, Hirose H, Eguchi T, Saito D, Ohki M, Yokota J. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POLI, REV1 and LIG4 with lung cancer risk. *Int J Cancer* 2005; 114: 730-737 [PMID: 15609317 DOI: 10.1002/ijc.20790]

96 Sobczuk A, Smolarz B, Romanowicz H, Zadrozny M, Baszczyński J, Westfal B, Pertyński T. Analysis of the polymorphisms in non-homologous DNA end joining (NHEJ) gene Ku70 and Ligase IV in sporadic breast cancer in women. *Pol J Pathol* 2010; 61: 27-31 [PMID: 20496270]

97 Han J, Hankinson SE, Ranu H, De Vivo I, Hunter DJ. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis* 2004; 25: 189-195 [PMID: 14578164 DOI: 10.1093/carcin/bgh002]

98 Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PP. Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res* 2002; 62: 3052-3057 [PMID: 12036913]

99 Kuschel B, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, Day NE, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD, Dunning A. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1399-1407 [PMID: 12023982]

100 Liu Y, Zhou K, Zhang H, Shugart YY, Chen L, Xu Z, Zhong Y, Liu H, Jin L, Wei Q, Huang F, Lu D, Zhou L. Polymorphisms of LIG4 and XRCC4 involved in the NHEJ pathway interact to modify risk of glioma. *Hum Mutat* 2008; 29: 381-389 [PMID: 18165945 DOI: 10.1002/humu.20645]

101 Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, Tsavachidis S, Liang FW, Gilbert M, Aldape K, Armstrong T, Houlston R, Hosking F, Robertson L, Xiao Y, Wiencke J, Wrensch M, Andersson U, Melin BS, Bondy M. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2467-2474 [PMID: 20368557 DOI: 10.1200/JCO.2009.26.6213]



## **CAPÍTULO VI**



## 6.1. Conclusões finais e perspectivas futuras

Os capítulos precedentes desta dissertação estão organizados sob a forma de artigo científico. Este formato, como é sabido, inclui uma secção em que se apresenta uma discussão circunstanciada dos resultados obtidos. Por este motivo, parece-nos redundante adicionar no final desta tese um capítulo de discussão sobre a generalidade dos nossos resultados, já que iríamos obrigatoriamente repetir argumentos já expressos nas secções de discussão de cada um dos capítulos anteriores desta dissertação. Optamos, assim, por apresentar de seguida, de um modo sucinto, as nossas conclusões finais e as perspectivas futuras que antevemos para a investigação até agora realizada e também a nossa visão pessoal sobre as ilações que podemos retirar deste estudo para a nossa atividade diária como oncologistas.

De acordo com os nossos resultados, verificamos que o genótipo *GSTM1* poderá ser um marcador molecular útil na predição da resposta das doentes com carcinoma epitelial do ovário à terapia de primeira linha com Paclitaxel e Platinos. A combinação de marcadores genéticos e clínicos poderá ser crucial para atingir uma melhoria significativa na sobrevivência destas doentes.

Otimizar a estratégia terapêutica do carcinoma do ovário e aumentar a incorporação racional e custo-efetiva dos agentes biológicos emergentes são domínios de elevada prioridade da prática clínica, que beneficiam e urgem da identificação de biomarcadores prognósticos e preditivos. A identificação de fatores responsáveis pela introdução de variabilidade na resposta ao tratamento das doentes tem se revelado um desafio. Prever a sensibilidade aos platinos antes do tratamento apresenta um elevado potencial para aumentar ou restaurar a quimiosensibilidade nas doentes resistentes e recorrentes e, assim, melhorar a sobrevivência por esta neoplasia.

Compreender a falência do tratamento com platinos poderá ser um passo essencial na tentativa de individualizar a terapêutica, selecionando as doentes mais prováveis de responder ao tratamento, com possibilidade de ajustar a dose e estratégias de seguimento. Os estudos futuros deverão obrigatoriamente avaliar o desenho de um nomograma de orientação terapêutica com evidentes benefícios para as doentes e sustentabilidade do sistema de saúde.

Como oncologista, uma das futuras perspectivas poderá passar pela realização de ensaios clínicos que incluam a validação destes biomarcadores tendo em conta a

sensibilidade e especificidade na sua capacidade preditiva de resposta e de prognóstico. Apesar das terapêuticas emergentes, nomeadamente os anti-angiogénicos e os inibidores da PARP, a quimioterapia baseada no duplete de Platino e Paclitaxel continua a ser essencial na abordagem desta patologia, como demonstrado pelos diversos ensaios clínicos.



