

**ANÁLISES DE PADRÕES DE CLUSTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO
DA SUBUNIDADE V1C1 DA V-ATPase: IDENTIFICANDO
MARCADORES MOLECULARES DE SUBTIPOS DE
ADENOCARCINOMA DE ENDOMÉTRIO**

ABDALLA DIB CHACUR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO - 2021**

ANÁLISES DE PADRÕES DE CLUSTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO
DA SUBUNIDADE V1C1 DA V-ATPase: IDENTIFICANDO
MARCADORES MOLECULARES DE SUBTIPOS DE
ADENOCARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

ABDALLA DIB CHACUR

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de doutor em Bioenergética do Câncer.

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO - 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C431 Chacur, Abdalla Dib.

ANÁLISES DE PADRÕES DE CLUSTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE V1C1 DA V-ATPase : IDENTIFICANDO MARCADORES MOLECULARES DE SUBTIPOS DE ADENOCARCINOMA DE ENDOMÉTRIO. / Abdalla Dib Chacur. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

55 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Arnoldo Rocha Facanha.

1. V-ATPase. 2. Prognóstico molecular. 3. Adenocarcinoma de endométrio. 4. Mutações genéticas. 5. Gene SLC. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ANÁLISES DE PADRÕES DE CLUSTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO
DA SUBUNIDADE V1C1 DA V-ATPase: IDENTIFICANDO
MARCADORES MOLECULARES DE SUBTIPOS DE
ADENOCARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

ABDALLA DIB CHACUR

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de doutor em Bioenergética do Câncer.

Aprovada em 02 de outubro de 2021

Comissão Examinadora:

Professor André Lacerda de Abreu Oliveira, D.Sc. (UENF)

Professora Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis, D.Sc. (UENF)

Professora Paula Gebe Abreu Cabral, D.Sc. (externo)

Professor Arnaldo Rocha Facanha, D.Sc. (UENF)
(Orientador)

“Dedico este trabalho aos meus pais e as minhas filhas.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os profissionais envolvidos nas atividades de pesquisa no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do CBB e da Unidade de Experimentos em Animais (UEA), pela forma gentil com que me receberam.

Agradeço ao meu aluno da Faculdade de Medicina de Campos, Antônio Mateus, pela parceria e ajuda no desenvolvimento das pesquisas, além da Heloysa Bousada pela sua indispensável participação.

Agradeço ao Professor André Lacerda, responsável pela administração da UEA, pela oportunidade que me concedeu à unidade, onde pude desfrutar de momentos de grandes aprendizagens. Agradeço, também, pela forma generosa e hábil que me arguiu durante minha qualificação.

Agradeço aos profissionais Ds Evenilton Pessoa Costa e Ds Josias Alves Machado pela forma habilidosa que me incentivaram durante todo o processo de doutoramento, servindo de exemplo no desenvolvimento de pesquisas.

Agradeço ao Professor Luís Felipe Ribeiro Pinto pela disponibilização do setor do INCA sob sua responsabilidade para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a todos os professores das disciplinas por mim cursadas pela oportunidade de aprendizado, especialmente a Professora Anna Okorokova Façanha pela forma magnífica de facilitar o aprendizado de temas, para mim, de difícil entendimento.

Agradeço ao Professor Arnoldo Rocha Façanha pela forma extremamente competente e habilidosa pela qual conduziu minha orientação, tanto no desenvolvimento da pesquisa quanto no desenvolvimento dos manuscritos. Tenho esperança de poder continuar no caminho tendo ele como exemplo de pesquisador e notável cientista.

Agradeço às instituições FAPERJ, CAPES e CNPQ pelo fomento provido às pesquisas ao meu orientador.

Agradeço, enormemente, a Juliana do Couto pela forma carinhosa e competente com que conduziu o processo de ensino-aprendizagem e desenvolvimento dos mínimos detalhes da pesquisa. Devo a ela todo e qualquer sucesso adquirido, desde a elaboração do projeto para a admissão ao doutorado, passando por todas as disciplinas cursadas, pelas técnicas dos experimentos em bancada, pelo ensino e viabilização da pesquisa in sílico, até a tese final. Serei eternamente grato a Juliana do Couto pela dedicação e paciência em todos os meus processos de aprendizagens no doutoramento.

Agradeço aos meus pais que sempre me mostraram o valor da ciência e da dedicação ao estudo a fim de alcançar a necessária diferenciação profissional. Ao casal, meus pais, todo meu eterno respeito, amor e admiração!

Por fim, agradeço a minha família, especialmente minha amada esposa, Cláudia Quaresma Chacur, pela forma incentivadora que sempre se manifestou, por meio de belas, amorosa e sabias palavras de força, fé e ânimo para seguir em frente. Que esta obra sirva para as minhas filhas - Daniella, Mariana e Laís - como de exemplo de perseverança para que alcancem seus próprios feitos.

À Deus todo poder e fé no caminho a seguir...

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	pg. 1
OBJETIVO	pg. 6
MATERIAL E MÉTODOS	pg. 7
RESULTADOS	pg. 11
DISCUSSÃO	pg. 21
CONCLUSÃO	pg. 33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pg. 34
ANEXOS	pg. 38

RESUMO

O câncer de endométrio é a neoplasia maligna mais frequente do corpo do útero e o adenocarcinoma endometrióide o tipo histológico mais comum. Embora seja doença usualmente diagnosticada em fases iniciais, por induzir precocemente manifestações clínicas, a taxa de sobrevivência diminui quando associada a critérios de pior prognóstico. Nestes casos, a doença progride mais rapidamente tornando-se metastática e, por vezes, com resposta limitada ao tratamento. Para além das características clínico-patológicas relacionadas a um pior prognóstico, o melhor entendimento do processo oncogênico em nível celular e molecular permitiria a determinação do real potencial de evolução desfavorável e instituição individualizada de modalidades terapêuticas mais adequadas para cada caso. Isto poderia ser obtido por meio da identificação de padrões moleculares que pudessem prever tal evolução. Dessa forma, seria possível destacar as neoplasias para as quais uma conduta menos agressiva poderia ser instituída, distinguindo-se daquelas em que, acertadamente, seria indicado um tratamento mais radical. Um biomarcador capaz de prever evolução desfavorável permitiria decisões médicas mais precisas e racionalização dos custos assistências. Dentre os alvos moleculares promissores, a V-ATPase tem ganhado destaque na oncologia por estar superexpressa na membrana plasmática de diferentes células tumorais, conduzindo a uma desregulação do pH intra e extracelular. Consequentemente, a V-ATPase tem sido associada a processos tipicamente alterados e presentes no câncer como proliferação, evasão à apoptose, invasão, metástase e resistência às drogas. A subunidade “C” da bomba, especialmente sua isoforma C1, mostra-se associada a uma montagem da enzima com maior eficiência catalítica, tendo em vista sua relação com a eficácia do acoplamento entre os dois domínios da V-ATPase. Este trabalho objetivou testar a hipótese, em banco de dados do TCGA, da existência de padrões de clusterização associados à expressão diferencial da isoforma C1 das V-ATPases no adenocarcinoma endometrióide que se mostrasse relacionada ao pior prognóstico deste câncer. As análises dos padrões moleculares de clusterização correlacionados com a expressão da isoforma C1 da V-ATPase revelaram genes (e.g., PTEN, P53, CTCF, mtFDH, SLC25A32) com os quais foi possível postular diferentes vias metabólicas oncogênicas que, em conjunto, permitiram subsidiar a identificação de subtipos de adenocarcinoma de endométrio com distinta agressividade biológica. Tais dados poderão prover um entendimento mais aprofundado dos mecanismos moleculares e bioquímicos presentes no câncer de endométrio bem como substanciar pesquisas complementares na busca de um biomarcador indicativo do real potencial evolutivo desfavorável desta neoplasia.

ABSTRACT

Endometrial cancer is the most common malignant neoplasm of the corpus of the uterus and endometrioid adenocarcinoma is the most common histological type. Although it is a disease usually diagnosed in its initial stages, as it induces early clinical manifestations, the survival rate is worse when associated with worst prognostic criteria. In these cases, the disease progresses more quickly, becoming metastatic and sometimes with limited response to treatment. In addition to the clinical and pathological characteristics related to a worse prognosis, a better understanding of the oncogenic process at the cellular level would allow the determination of the real potential for unfavorable evolution and the individualized institution of the most appropriate therapeutic modalities for each case. This could be established through the identification of molecular patterns that could predict such evolution. Thus, it would be possible to highlight neoplasms for which a less aggressive approach could be instituted, distinguishing from those in which, rightly, a more radical treatment would be indicated. A biomarker capable of predicting unfavorable evolution would allow more accurate medical decisions and rationalization of care costs. Among the promising molecular targets, V-ATPase has gained prominence in oncology for being overexpressed in the plasma membrane of different tumor cells, leading to a dysregulation of intra and extracellular pH. Consequently, a V-ATPase has been associated with processes typically altered and presents in cancer as proliferation, avoidance of apoptosis, invasion, metastasis and drug resistance. The "C" subunit of the pump, especially its C1 isoform, is associated with an enzyme assembly with greater catalytic efficiency, considering its relation with the coupling performance between the two V-ATPase domains. This study aimed to test the hypothesis, in a TCGA database, of the existence of clustering patterns associated with the differential expression of the C1 isoform of V-ATPases in endometrioid adenocarcinoma that could be related to a worse prognosis of this cancer. The analysis of molecular clustering patterns correlated with the expression of the C1 isoform of V-ATPase revealed genes (e.g., PTEN, P53, CTCF, mtFDH, SLC25A32) with which it was possible to postulate different oncogenic metabolic pathways that, taken together, allowed to support the identification of subtypes of endometrial adenocarcinoma with distinct biological aggressiveness. These data can contribute to provide a deeper understanding of the molecular and biochemical mechanisms present in the endometrial cancer as well as substantiate further research in the search for a biomarker indicative of the unfavorable evolutionary potential of this neoplasm.

1. INTRODUÇÃO

O câncer do corpo do útero constitui o sexto câncer mais comum na população feminina, tendo tido uma estimativa mundial de 320 mil novos casos em 2012, o que correspondeu a 4,8% dos tumores femininos e 2,3 % dos cânceres em geral. Naquele ano, 76 mil óbitos por câncer endometrial foram registrados, o que representou 2,1% das mortes por câncer (Ferlay et al., 2012).

Segundo estimativa, em 2018 o câncer de endométrio foi a segunda neoplasia ginecológica mais incidente no mundo, com 382.069 novos casos e 89.929 óbitos (Bray et al. GLOBOCAN 2018). Nos Estados Unidos, desde 1972, ano que marcou o início dos programas de prevenção e de diagnóstico precoce voltados para o câncer do colo do útero, o câncer de endométrio vem se destacando como a neoplasia maligna que mais acomete o trato genital feminino naquele país. A Sociedade Americana de Câncer estimou que, em 2010, cerca de 43.470 novos casos surgiriam nos EUA e que 7.950 mortes ocorreriam em decorrência desta doença (American Cancer Society, 2010). No Canadá, no período de 2005 a 2013, o câncer de endométrio aumentou em 2,3% ao ano, o que pode ter sido associado a maior utilização de estrogênio como terapia de reposição hormonal no climatério ocorrida naquele período (Canadian Cancer Society, 2017).

No Brasil, foram estimados 6.540 casos novos de câncer do corpo do útero para cada ano do triênio 2020-2022, com um risco calculado de 6,07 casos novos a cada 100 mil mulheres, ocupando a oitava posição dentre os cânceres que mais acometem a população feminina (exceto tumores de pele não melanoma). Na região sudeste sua incidência é maior, representando o sexto câncer mais incidente, com um risco aproximado de 7,45 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

O câncer que acomete o corpo do útero pode ter origem no endométrio, que representa 90% dos casos, ou no miométrio. O câncer de endométrio mais frequente tem origem epitelial, sendo representado pelo adenocarcinoma endometrióide (mais de 80% dos casos) e variações menos comuns como o carcinoma seroso, de células claras, mucinoso (Ambros & Kurman, 1992; Boyle & Levin, 2008).

O câncer de endométrio é classificado em tipo I e II. Os tumores do tipo I normalmente derivam de processos hiperplásicos e estão relacionados com uma maior atividade estrogênica, geralmente são bem diferenciados e, portanto, de baixo grau histológico e de melhor prognóstico. No tipo I, o adenocarcinoma endometrióide é o tipo histológico mais frequente e as mutações genéticas mais evidentes estão relacionadas com o PTEN (Fosfatase lipídica, homóloga à tensina, a qual, em humanos, atua como supressor de tumores, regulando negativamente a via PI3K/Akt/mTOR, estimulando a apoptose e controlando a proliferação celular). Especificamente, múltiplas modificações pós-traducionais, incluindo acetilações, fosforilações, ubiquitinações, e modificações redox têm sido descritas como importantes fatores moduladores da integridade estrutural, atividade catalítica e localização subcelular desta enzima (Singh & Chan, 2011; Liu et al., 2019).

Já os tumores tipo II não estão associados com atividade endócrina. Não são, dessa forma, considerados estrogênio dependentes, surgem a partir do endométrio atrófico e são geralmente indiferenciados, portanto, de maior grau histológico e de pior prognóstico. São mais frequentemente representados pelo adenocarcinoma seroso e de células claras. O tipo II mostra-se mais associado com a mutação da p53 (Stewart & Wild, 2014), gene que codifica uma das proteínas supressoras tumorais mais estudadas, por representar um dos oncogenes mais característicos em grande parte dos diferentes tipos de cânceres. A proteína p53 é um fator de transcrição que controla a expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e senescência, mas que também regula o metabolismo celular, o que parece desempenhar um papel fundamental na supressão tumoral. Estas funções não canônicas de p53 incluem interações com elementos chaves do metabolismo de glicose (Kawauchi et al., 2008) e lipídico (Parrales & Iwakuma, 2016), e dos sistemas de transporte iônico (Long et al., 1998), cujas relações com a progressão do câncer ainda requerem elucidação.

Os principais fatores de risco do câncer de endométrio associam-se aos efeitos proliferativos decorrentes da exposição prolongada ao estrogênio, principalmente quando persistente e sem oposição da progesterona. Este estímulo hormonal anômalo pode advir como resultante de diversas situações clínicas, sendo as mais comuns aquelas que cursam com anovulação ou obesidade, quando há maior conversão periférica de estrogênio a partir da aromatização de

precursores de androgênio. O estrogênio leva à proliferação das glândulas endometriais, agindo como agente promotor da hiperplasia. Em pacientes com risco, um clone mutante pode surgir em glândulas fenotipicamente normais e progredir sob a ação persistente deletéria do estrogênio, situação que decorre quando não há contraposição da progesterona. Com o acúmulo do dano genético, o clone mutante prolifera sob o estímulo mitogênico do estrogênio e leva às alterações histológicas que podem culminar em hiperplasia e promover a transformação maligna (Sanderson, 2017).

A idade também se apresenta como fator de risco para o câncer de endométrio. O pico de incidência manifesta-se entre a quinta e a sexta década de vida, sendo 60 anos a idade média das portadoras desta neoplasia. Outros fatores incluem raça branca, menarca precoce e menopausa tardia, nuliparidade, uso de tamoxifeno, diabetes tipo 2, hipertensão arterial e hereditariedade (Kurman, 1992).

As bases do estadiamento atual do câncer de endométrio foi proposta pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) em 1988 no Rio de Janeiro, tendo sido revisado em 2009 (Revised FIGO staging for gynaecological cancer, 1989). Estabeleceram-se critérios cirúrgicos em detrimento do estadiamento clínico antes vigente, menos acurado, passando-se a valorizar como critérios evolutivos principais a profundidade da invasão miometrial e o comprometimento linfonodal (FIGO Committee on Gynecologic Oncology - FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. Int J Gynaecol Obstet. 2014).

Para além dos critérios clínicos-patológicos relacionados com um pior prognóstico, como estadiamento, tipo histológico, grau histológico, idade, diante do diagnóstico de câncer de endométrio deparamo-nos com a necessidade de decisões terapêuticas mais precisas, ajustadas conforme a determinação da agressividade tumoral frente ao comportamento biológico da doença. Assim, reveste-se de importância a identificação em cada tumor de anormalidades que sejam intrinsecamente relacionadas ao processo evolutivo do câncer. Isto poderia ser obtido ao se evidenciar padrão molecular presente no processo oncogênico que permitisse prever mais seguramente a evolução desfavorável. A identificação deste padrão poderia substanciar pesquisas complementares que visassem à

identificação de biomarcador que, além de fortalecer a hipótese de pior prognóstico em determinado caso, também pudesse ser perscrutado nas principais anormalidades do endométrio consideradas benignas, a fim de predizer o real potencial oncogênico de cada uma para o adenocarcinoma, considerando-as, assim, como precursoras do câncer aquelas que, de fato, abrigam processos evolutivos indubitáveis em direção à malignidade.

Nesse contexto, seria possível identificar com mais precisão os casos de câncer de endométrio com potencial maior de evolução desfavorável, colaborando para decisões terapêuticas mais precisas. Além disso, este achado permitiria campo de estudo promissor visando à identificação de possível sinalização molecular útil para se destacar as portadoras de patologias endometriais benignas para as quais uma conduta conservadora poderia ser instituída, distinguindo-se daquelas em que seriam, verdadeiramente, indicado um tratamento cirúrgico. Um biomarcador seguro capaz de predizer tanto a evolução desfavorável do câncer quanto o real potencial oncogênico de patologias benignas do endométrio permitiria decisões médicas mais eficazes e racionalização dos custos assistências, evitando-se, desta forma, cirurgias radicais desnecessárias bem como as comorbidades delas decorrentes.

V-ATPases

V-ATPases são enzimas translocadoras de prótons, transportando ativamente íons H^+ através de membranas, tanto a plasmática quanto as de organelas, a partir da hidrólise de ATP. A energia liberada nesta reação permite mudanças conformacionais na molécula acopladas ao transporte de prótons para fora da célula quando situadas na membrana plasmática ou para o lúmen intracelular, no caso daquelas presentes em endomembranas. O gradiente eletroquímico de prótons energiza as membranas e o acúmulo de H^+ acidifica o compartimento para o qual são dirigidos os prótons, o que permite as condições adequadas para uma série de processos celulares necessários ao normal funcionamento da célula (Stransky, 2016).

Essas bombas de H^+ , quando alocadas em membranas plasmáticas assumem importância em diversos processos desenvolvidos em tecidos especializados, como, por exemplo, a acidificação da urina realizada por células intercalares dos túbulos distais e coletores renais. Estão, também, relacionadas à manutenção das condições adequadas de produção e estocagem de espermatozoides além da atividade de reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos (Li, 1999).

As V-ATPases também são encontradas ativas na membrana plasmática de células tumorais. Sua análise tem ganhado destaque na oncologia por estarem superexpressas na membrana plasmática de diferentes células neoplásicas, o que tem sido postulado induzir uma desregulação do pH intra e extracelular. Dessa forma, as V-ATPases superexpressas na membrana plasmática de células neoplásicas estão associadas a uma maior acidificação do meio extracelular, favorecendo processos relacionados com um pior prognóstico da doença, tais como invasão, metástase e resistência à quimioterapia (Weeb *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015).

As V-ATPases são compostas por 13 subunidades, divididas em oito proteínas periféricas agrupadas num domínio citoplasmático denominado V_1 (A-H), responsável pela hidrólise do ATP, e 5 proteínas intrínsecas de membrana compondo um domínio denominado V_0 , representadas pelas subunidades c, c', a, d e 'e'. Em mamíferos, algumas subunidades da enzima apresentam diferentes isoformas. Existem isoformas ubíquas e outras que estão presentes somente em células especializadas, nas quais as V-ATPases presentes realizam papéis e funções específicos. A subunidade "C", que é importante para o reversível acoplamento estrutural e funcional dos domínios V_1 e V_0 e, portanto, para a eficiência catalítica da enzima, apresenta 3 isoformas em humanos, C1, C2a e C2b. A isoforma C1 tem sido estudada na área da oncologia por haver sido observada sua superexpressão diferencial em vários tipos de câncer como de mama, boca e esôfago (Holliday *et al.*, 2014; Cotter, 2015).

Em recente estudo usando a plataforma bioinformática The Cancer Genome Atlas (TCGA), foi descrita a expressão diferencial dos genes que codificam para todas as subunidades e respectivas isoformas da V-ATPase, presentes no

câncer de esôfago. Tanto no carcinoma espinocelular quanto no adenocarcinoma, o nível de expressão de C1 foi superior ao de C2, fato corroborado pelos resultados obtidos por qRT-PCR. Além disso, o mesmo estudo mostrou que a análise do nível de expressão do mRNA de C1 e de C2 foi capaz de diferenciar a neoplasia do tecido normal, sendo os melhores resultados obtidos pela relação C1/C2. Esses resultados forneceram evidências convincentes de que a análise do desequilíbrio das isoformas da subunidade C da bomba, caracterizada pela dominância de C1, poderia revelar promissores alvos na busca por novos oncomarcadores (Couto-Vieira et al., 2020).

2. OBJETIVO

Nosso trabalho objetivou analisar *in silico* a existência de padrões de clusterização de genes com potencial para marcadores moleculares da carcinogênese, associados à expressão diferencial da isoforma C1 da V-ATPase no adenocarcinoma endometrióide, viabilizando maior exaustão na detecção e caracterização de tumores com pior prognóstico deste câncer.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Análise de expressão dos genes da V-ATPase através de dados do The Cancer Genome Atlas (TCGA) no cBioPortal

O cBioPortal (www.cbioportal.org) foi utilizado para acessar dados genômicos e clínicos do carcinoma endometrial do TCGA, na base de dados PanCancer (n=529 amostras). O tipo histológico selecionado foi o adenocarcinoma endometrióide (n= 399), que representou 75,4% dos casos disponibilizados. Destes, 397 apresentavam informação de expressão por RNA-seq – (RNAseq V2 RSEM), traduzindo o percentual de 99,5% das amostras. Os níveis de mRNA foram avaliados para todos os genes da V-ATPase (genes que codificam tanto as subunidades quanto suas respectivas isoformas, e de ambos os domínios V₁ e V₀), totalizando 25 genes conhecidos, abaixo relacionados:

Domínio V1: *ATP6V1A*, *ATP6V1B1*, *ATP6V1B2*, *ATP6V1C1*, *ATP6V1C2*,
ATP6V1D, *ATP6V1E1*, *ATP6V1E2*, *ATP6V1F*, *ATP6V1G1*,
ATP6V1G2, *ATP6V1G3*, *ATP6V1H*.

Domínio V0: *ATP6V0A1*, *ATP6V0A2*, *TCIRG1*, *ATP6V0A4*, *ATP6V0C*,
ATP6V0B, *ATP6V0D1*, *ATP6V0D2*, *ATP6V0E1*, *ATP6V0E2*,
ATP6AP1, *ATP6AP2*.

As informações clínico-patológicas coletadas, sempre que disponíveis, foram mutação, idade, gestações, status da menopausa, história de TRH, uso de tamoxifeno, peso, altura da paciente, hipertensão arterial, diabetes, estadiamento, grau histológico, percentual de invasão, sobrevida (meses), linfonodos examinados, história de câncer colo-retal.

Foi analisado o panorama das alterações genéticas da V-ATPase presentes no adenocarcinoma endometrióide, por meio de *heatmaps* das expressões de todos os genes de interesse, visando a verificações de possíveis padrões semelhantes de expressão em relação ao padrão obtido em V1C1. Além disso, procedemos as análises das expressões conforme o grau histológico da neoplasia e a verificação de coexpressões significantes. Criamos dois grupos no

que tange aos casos de maior e menor expressão de V1C1 (z-score). Consideramos alta expressão quando >1 e baixa quando <-1 .

Foram analisadas as expressões comparadas entre os dois grupos obtidos (C1_high >1 e C1_low <-1) em relação ao grau histológico e as mutações genéticas mais incidentes. Analisamos, também, a correlação entre o padrão diferencial de expressão de V1C1 com o de outros genes e com a expressão de proteínas.

Análise da expressão das isoformas C1 e C2 da V-ATPase por imuno-histoquímica (Anexo 1).

Foram realizados levantamentos retrospectivos de blocos de parafina de material de endométrio normal, pólipos endometriais, hiperplasia (típica e atípica), e de adenocarcinoma de endométrio no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Escola Álvaro Alvim, obtidos a partir de peças cirúrgicas. Objetivamos obter um tamanho amostral de cerca de 80 blocos, sendo 20 de cada histopatologia descrita. A partir dos blocos de parafina foram realizados testes de imuno-histoquímica para verificar a expressão da isoforma C1 e C2 em cada tipo histológico, cuja técnica será descrita adiante.

Elaboramos folha de protocolo de investigação contendo o nome, prontuário, número do caso na pesquisa, número do bloco, idade, paridade, status menstrual (pré ou pós-menopausa), presença de sangramento uterino anormal, resultado histopatológico e os dados da imuno-histoquímica respectiva (Anexos 2 e 3). Todos os dados clínicos e anatomopatológico foram obtidos por meio da análise dos prontuários, após ter sido obtida autorização específica pela direção do HEAA e do Serviço de Anatomia Patológica do hospital (Anexo 4). As pacientes foram contatadas para comparecerem a entrevista para que fossem explicados os objetivos da pesquisa e eventuais riscos inerentes além da assinatura do TCLE (Anexo 5). O projeto foi submetido ao CEP da instituição, cuja aprovação (CAAE: 87472918.9.0000.5244) determinou o início da coleta dos dados e da realização da pesquisa (Anexo 6).

Os casos que se mostraram com dados incompletos ou não obtiveram autorização expressa da paciente ou da sua responsável foram excluídos da

pesquisa, sendo substituídos por outros que preencheram os critérios de inclusão. Os blocos dos casos incluídos na pesquisa foram levados ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do CBB da UENF para realização de imunohistoquímica para C1 e C2 da V-ATPase.

Imuno-histoquímica

Para imunohistoquímica foram realizadas secções seguidas de 3 µm de cada bloco. O kit CINtec Histology (Biogen/Roche) foi utilizado conforme instruções do fabricante. Resumidamente, os cortes foram fixados nas lâminas através de uma incubação a 60°C overnight, em estufa. A desparafinização do material foi realizada através da imersão das lâminas em 6 banhos de xilol a 5 minutos cada, seguido de 6 banhos de etanol absoluto de 3 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada por calor em banho-maria 95-99°C por 10 minutos. As secções foram delimitadas com caneta Dako Pen (Dako®) e incubadas em 3 banhos de 5 minutos com tampão de lavagem (8550 – Roche).

Logo após, os cortes foram incubados em solução inibidora de peroxidase endógena (fornecida pelo kit) por 20 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e incubadas em 1 banhos de 5 minutos com tampão de lavagem. Em seguida, adicionou-se o anticorpo específico contra C1 e C2, após preparo da diluição ideal do anticorpo em solução diluidora (DAKO), conforme padronização estabelecida pelo fabricante, e deixado em incubação por 1 hora; o controle negativo recebeu apenas a solução diluidora (fornecida pelo kit). As lâminas receberam 1 banhos por 5 minutos com tampão de lavagem. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas com reagente de visualização (fornecido pelo kit) por 30 minutos.

As lâminas foram, então, incubadas em 3 banhos de 5 minutos com tampão de lavagem. O processo de revelação foi feito através da coloração por DAB (fornecido pelo kit) por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina (EasyPath). Por fim, para a montagem das lâminas em meio permanente à base de xilol foi necessário um procedimento de desidratação

realizado por imersão em série alcoólica de 6 concentrações, seguidos de diafanização por imersão seriada em 6 banhos de xilol.

Objetivou-se que as avaliações da imunomarcação fossem realizadas por dois patologistas independentes, sendo que, em caso de discordâncias, a dúvida seria dirimida por revisão dos casos e busca na obtenção de consenso. As avaliações das amostras das lâminas coradas foram de acordo com um sistema de classificação binário composto pelas classificações "positivo" ou "negativo". A classificação "positivo" foi atribuída às amostras que apresentaram uma coloração citoplasmática e nuclear contínua ("padrão de coloração difusa"), e "negativa" na ausência de tais padrões de colorações.

4. RESULTADOS

Verificamos que as alterações genéticas são eventos raros envolvendo os genes da V-ATPase no adenocarcinoma endometrióide (Figura 1) e não encontramos relação significativa com nenhum dos critérios clínicos-patológicos disponíveis no banco de dados TCGA (Firehose Legacy).

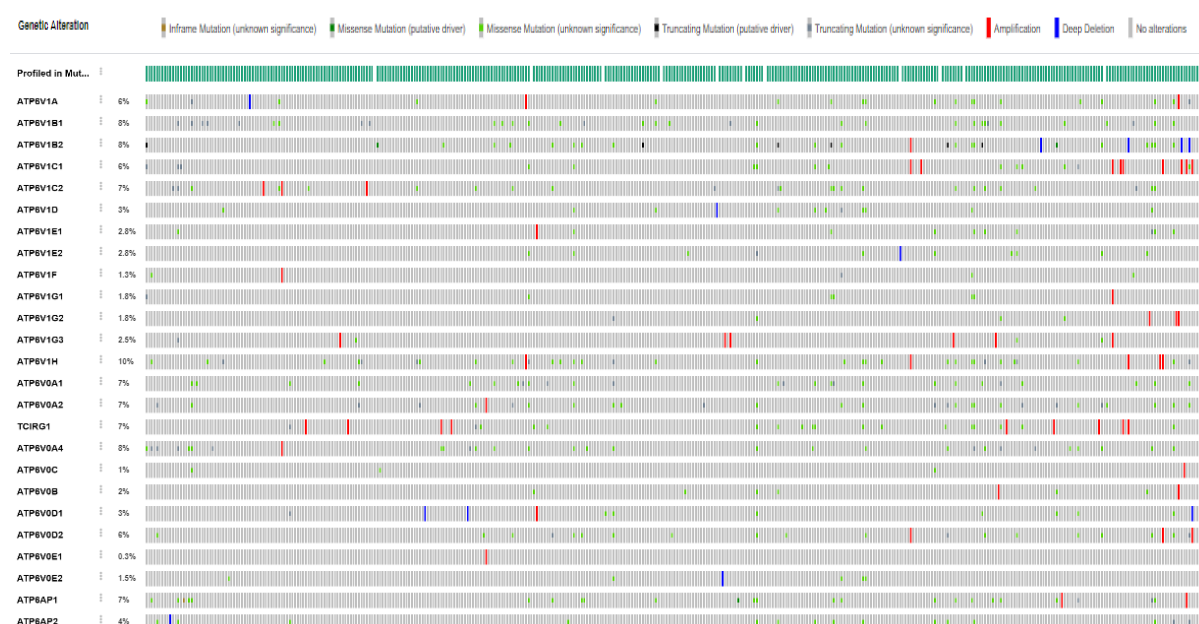


Figura 1: Alteração genética nos genes da V-ATPase é evento raro no adenocarcinoma endometrióide.

O *Heatmap* obtido a partir da compilação das expressões de todos os genes que compõem a estrutura multimérica da V-ATPase, organizado em relação ao padrão de V1C1 (Figura 2), evidenciou padrões de co-expressão com os genes V1H, V1A e V1B2 e padrões inversos de expressão de V1C1 em relação aos genes V0C, V0A1, V0D1, V0B e TCIRG1 (a2). Tal padrão diferencial foi reforçado quando foram analisados somente os dois grupos de expressão (C1 high>1 e C1 low<-1) e organizado conforme a expressão de V1C1 (Figura 3).

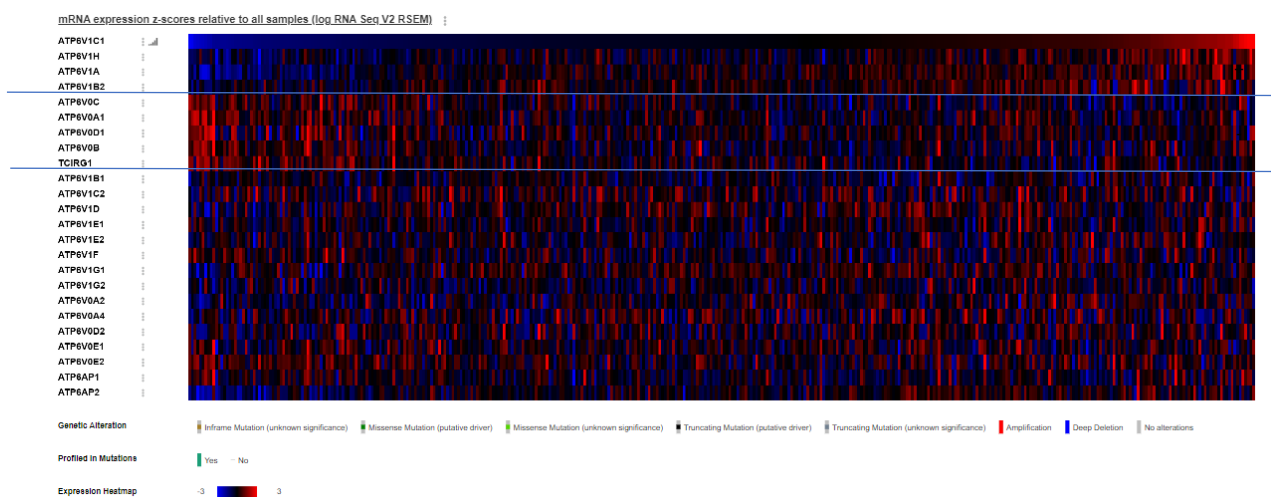


Figura 2: Heatmap com todos os genes da V-ATPase e organizado conforme a expressão de ATP6V1C1.

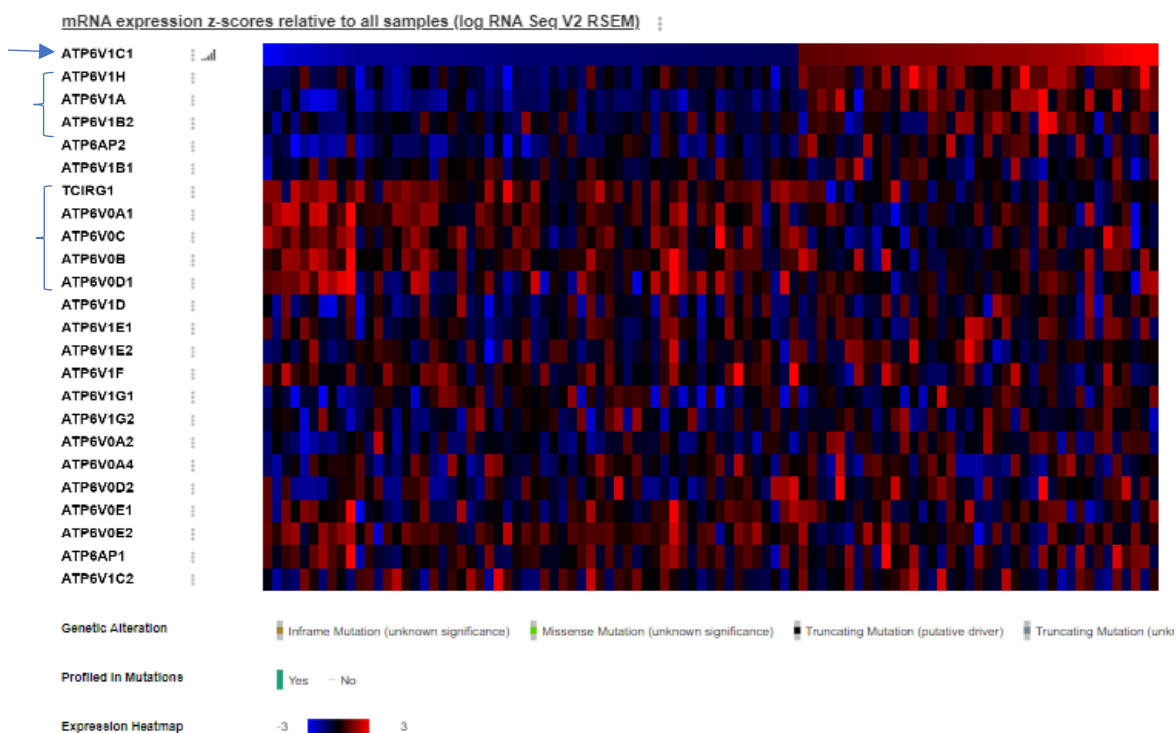


Figura 3: Heatmap somente com os dois grupos de expressão e organizado conforme a expressão de ATP6V1C1.

A análise da coexpressão de C1 com os genes da V-ATPase mostrou relações estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos genes V1H, V1A e V1B2 (Figura 4).

Correlated Gene	Cytoband	Spearman's Correlation	p-Value	q-Value ▲
ATP6V1A	3q13.31	0.544	5.57e-32	3.71e-29
ATP6V1H	8q11.23	0.473	1.79e-23	3.74e-21
ATP6AP2	Xp11.4	0.358	1.99e-13	4.39e-12
ATP6V1B2	8p21.3	0.329	1.80e-11	2.63e-10
ATP6V0C	16p13.3	-0.303	7.52e-10	7.97e-9
ATP6V0A2	12q24.31	0.270	4.63e-8	3.54e-7
ATP6V0A1	17q21.2	-0.202	5.171e-5	2.119e-4
ATP6V0B	1p34.1	-0.180	3.027e-4	1.058e-3
ATP6AP1L	5q14.2	-0.146	3.609e-3	9.731e-3
ATP6V0E2	7q36.1	-0.130	9.673e-3	0.0232
ATP6V1F	7q32.1	-0.121	0.0159	0.0359
ATP6AP1	Xq28	-0.110	0.0290	0.0605
ATP6V1G1	9q32	0.102	0.0421	0.0831
ATP6V1G2	6p21.33	0.0947	0.0595	0.111
ATP6V1D	14q23.3	0.0927	0.0650	0.120
ATP6V0D2	8q21.3	0.0813	0.106	0.180
ATP6V1E2	2p21 2p16-p12	0.0700	0.164	0.258
ATP6V0D1	16q22.1	-0.0668	0.184	0.283
ATP6V1G3	1q31.3	-0.0914	0.352	0.472
ATP6V0E1	5q35.1	-0.0332	0.510	0.622

Figura 4: Análise de coexpressão de V1C1 com todos os genes conhecidos ATP6 da V-ATPase mostrando as maiores significâncias estatística com os genes V1A, V1H.

Expressão diferencial de V1C1 e grau histológico

Os dois grupos criados conforme a expressão de C1 totalizaram 97 casos, sendo C1 high >1 ($n=39$) e C1 low <-1 ($n=58$). A verificação das expressões conforme o grau histológico (G1/G2/G3) mostrou que as maiores expressões de V1C1 ocorreram nos casos de maior grau (G3) e que esta situação também ocorreu em relação aos genes V1H, V1A, V1B2. Este fato foi verificado pelos *heatmaps* obtidos quando se considerou todas as expressões dos genes da V-ATPase (Figura 5) e, também, quando foram analisados apenas os casos de maior e menor expressão gênica (Figura 6).

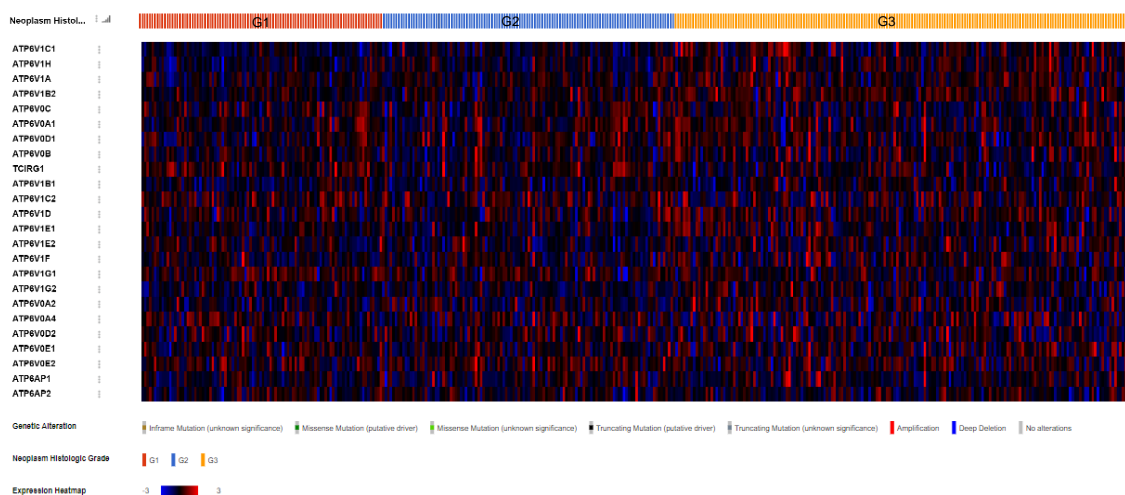


Figura 5: Expressões conforme o grau histológico (G1/G2/G3) considerando-se todos os casos analisados, n=397: 99,5% das amostras.

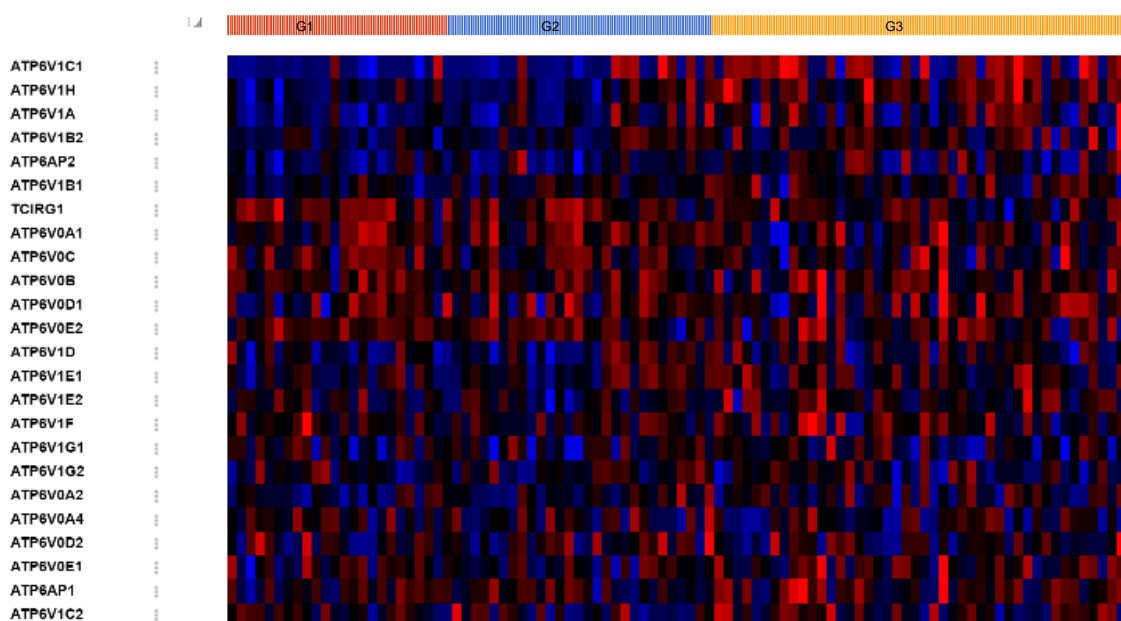


Figura 6: Heatmap das expressões dos genes ao se analisar somente os grupos de maior e menor expressão conforme o grau histológico (G1/G2/G3) n=97 casos.

A análise comparada do grau histológico dos dois grupos obtidos de expressões mostrou, igualmente, que o grupo C1_high>1 se associou com significância estatística com os casos de maior grau histológico (G3), com valor de

$p= 1.12e-7$. Já no grupo em que foram identificadas as expressões de C1 mais baixas, isto é, grupo de $C1_{low}<-1$, houve distribuição homogênea dos graus histológicos (G1/G2/G3) – Figura 7.

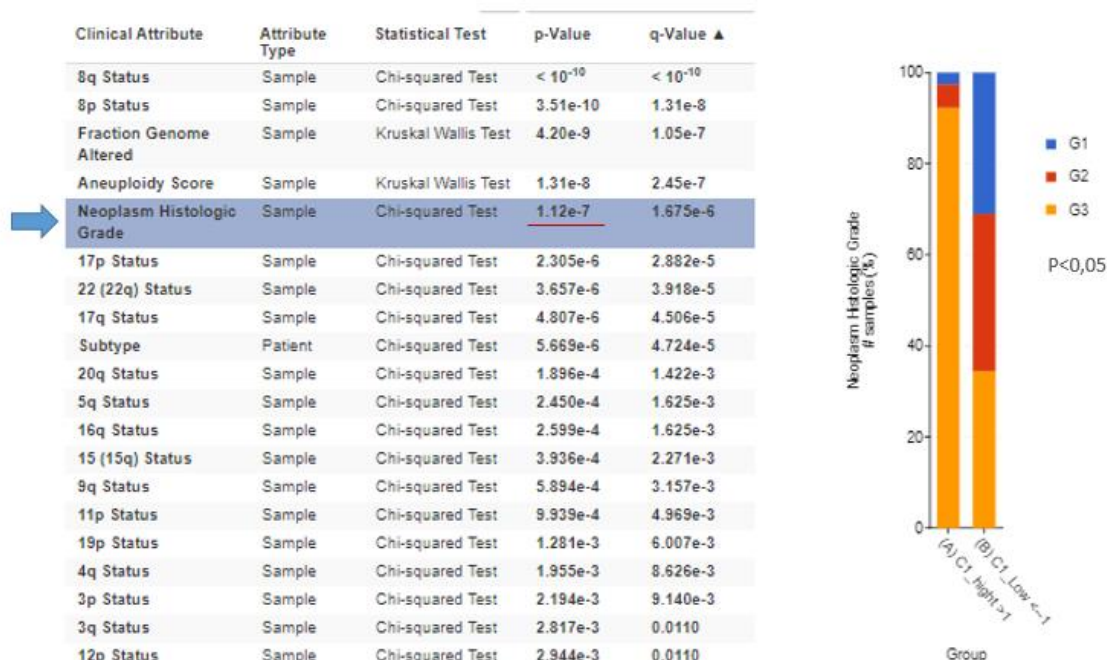


Figura 7 – Significância estatística ($p=1.12e-7$) da expressão diferencial conforme o grau histológico (em destaque) e distribuição dos graus histológicos (G1/G2/G3) nos dois grupos, isto é, de maior ($C1_{high} >1$) e menor expressão ($C1_{low} <-1$) de V1C1.

Expressão diferencial de V1C1 e mutações genéticas

Os dois genes mais frequentemente alterados foram PTEN e PIK3CA, ambos verificados com maior frequência no grupo de C1 baixo, enquanto o gene TP53 mutado foi mais frequente e estatisticamente significativo ($p<0,05$) nos casos em que a expressão de C1 foi mais elevada. A mutação do gene TP53 foi destaque dentre todas as mutações verificadas e preponderantemente maior no grupo $C1_{high} >1$, com valor de p de $1.95e-7$, seguido em significância pela mutação do PTEN e do CTCF, que se mostraram mais prevalentes no grupo $C1_{low} <-1$, com valores de p respectivos de $5.885e-5$ e $9.112e-4$ (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12).

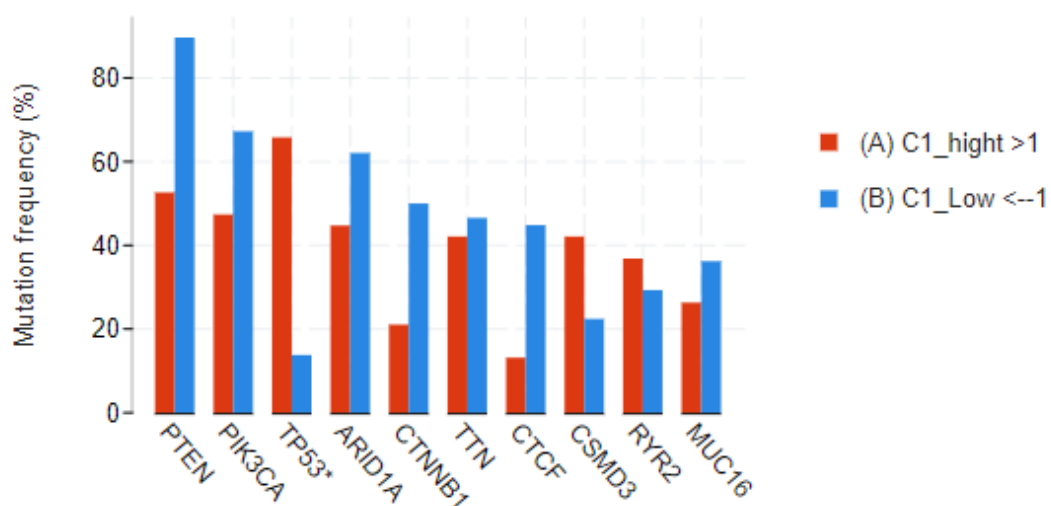


Figura 8 – Principais mutações genéticas verificadas nos grupos C1_high>1 (vermelho) e C1_low<-1 (azul), com destaque para PTEN, PIK2CA, TP53.

Gene	Cytoband	(A) C1_high >1	(B) C1_Low <--1	Co-occurrence Pattern	p-Value	Enriched in
TP53	17p13.1	25 (65.79%)	8 (13.79%)		1.95e-7	(A) C1_high >1
PTEN	10q23.31	20 (52.63%)	52 (89.66%)		5.885e-5	(B) C1_Low <--1
CTCF	16q22.1	5 (13.16%)	26 (44.83%)		9.112e-4	(B) C1_Low <--1
RBBP8	18q11.2	7 (18.42%)	0 (0.00%)		1.059e-3	(A) C1_high >1
ATG9A	2q35	6 (15.79%)	0 (0.00%)		2.978e-3	(A) C1_high >1
CKAP4	12q23.3	6 (15.79%)	0 (0.00%)		2.978e-3	(A) C1_high >1
MEOX2	7p21.2	6 (15.79%)	0 (0.00%)		2.978e-3	(A) C1_high >1
NACAD	7p13	6 (15.79%)	0 (0.00%)		2.978e-3	(A) C1_high >1

Figura 9 – Mutações genéticas verificadas nos grupos: C1_high >1 e C1_low <-1 mais significantes estatisticamente.

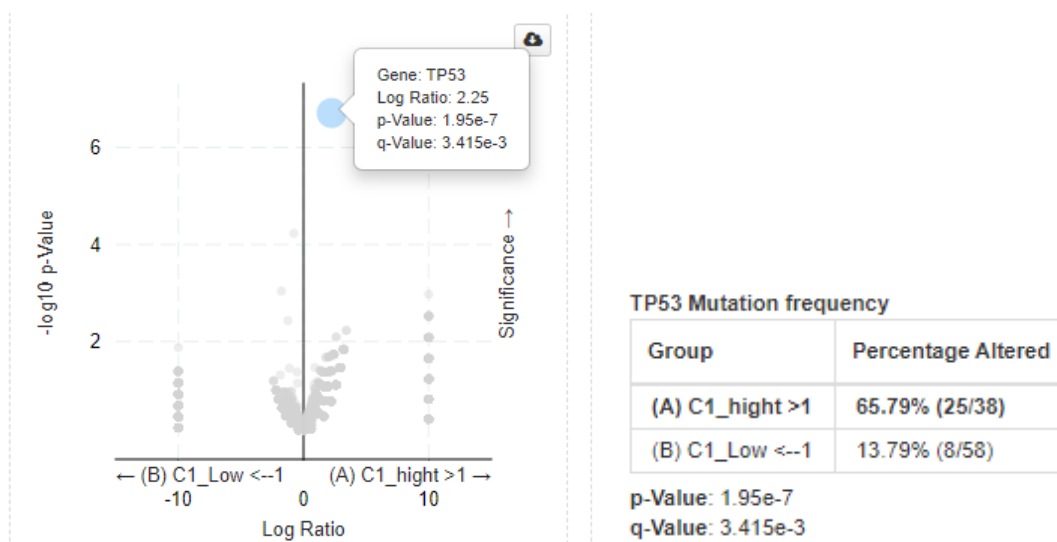


Figura 10 – Relação da mutação do TP53 com o grupo de maior expressão de C1 (C1_high >1).

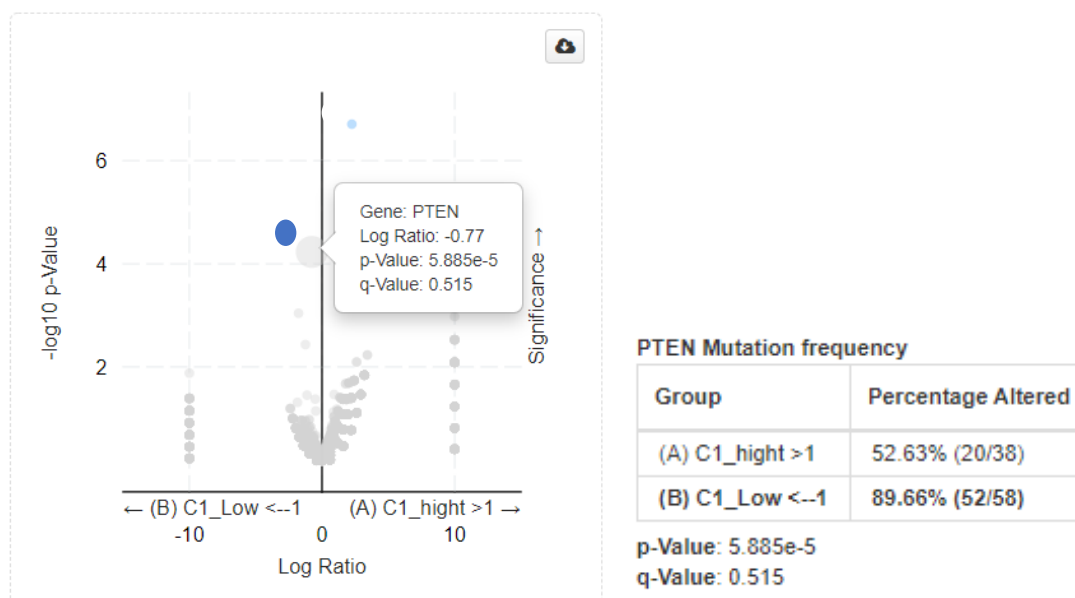


Figura 11 – Relação da mutação do PTEN com o grupo de menor expressão de C1 (C1_Low<-1).

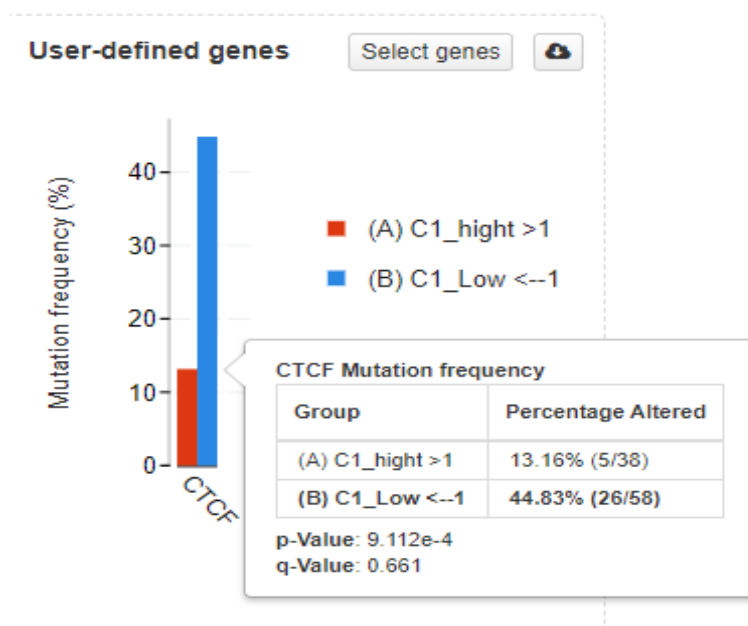


Figura 12 – Relação da mutação do CTCF com o grupo de menor expressão de C1 (C1_Low<-1).

Correlações entre expressão diferencial de V1C1 e outros genes

As correlações de expressão de V1C1 mais significativas foram verificadas com os genes da família SLC, genes que codificam proteínas de membranas, cujo destaque foi o gene SLC25A32, com *valor de p* 4.07e-49 (Figura 13).

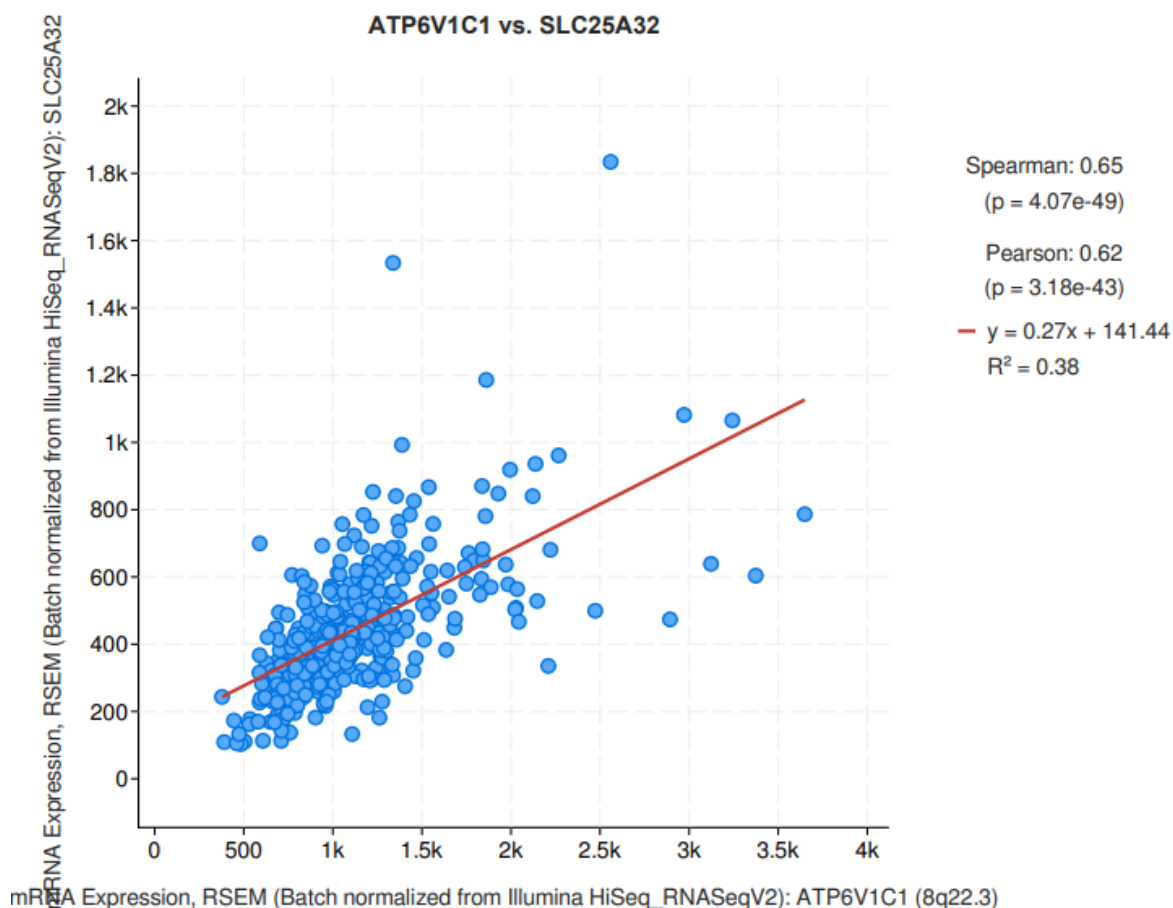


Figura 13 – Análise da co-expressão entre V1C1 com SLC25A32.

Expressão diferencial de V1C1 e expressão de proteínas

Dentre as proteínas mais expressas no adenocarcinoma endometrióide, as que apresentaram as maiores significâncias estatísticas estão associadas à via de mTOR, como TSC2, BAX e AKT e se relacionaram com o padrão de menor expressão de C1 (Figura 14).

Gene	Log Ratio	p-Value	q-Value	Higher expression in
PRKAA1_PT172	-0.49	1,75E-01	0.0301	(B) C1_low <--1
CTNNB1	-0.92	2,90E-01	0.0301	(B) C1_low <--1
SRC	0.43	3,27E+00	0.155	(A) C1_higt >1
CDH1	-0.74	3,55E+00	0.155	(B) C1_low <--1
TSC2	-0.53	3,75E+00	0.155	(B) C1_low <--1
AKT1_PS473	-0.88	6,90E+00	0.179	(B) C1_low <--1
AKT2_PS473	-0.88	6,90E+00	0.179	(B) C1_low <--1
AKT3_PS473	-0.88	6,90E+00	0.179	(B) C1_low <--1
CDKN1B_PT157	0.10	9,08E+00	0.188	(A) C1_higt >1
BAX	-0.28	9,73E+00	0.188	(B) C1_low <--1
MET	0.14	9,98E+00	0.188	(A) C1_higt >1
NF2	-0.32	0.0149	0.213	(B) C1_low <--1
MAPK9	-0.27	0.0150	0.213	(B) C1_low <--1
ARAF_PS299	0.22	0.0163	0.213	(A) C1_higt >1
PECAM1	0.18	0.0170	0.213	(A) C1_higt >1
TSC1	-0.22	0.0184	0.213	(B) C1_low <--1
AKT1_PT308	-0.69	0.0196	0.213	(B) C1_low <--1
AKT2_PT308	-0.69	0.0196	0.213	(B) C1_low <--1
AKT3_PT308	-0.69	0.0196	0.213	(B) C1_low <--1
CHEK2_PT68	0.25	0.0224	0.231	(A) C1_higt >1
MYH9_PS1943	-0.44	0.0241	0.237	(B) C1_low <--1
SNAI1	0.18	0.0253	0.238	(A) C1_higt >1
RPS6KB1_PT389	0.20	0.0272	0.245	(A) C1_higt >1
G6PD	0.33	0.0300	0.254	(A) C1_higt >1
ANXA1	-0.76	0.0307	0.254	(B) C1_low <--1
ESR1	-0.90	0.0337	0.265	(B) C1_low <--1
TP53BP1	-0.41	0.0345	0.265	(B) C1_low <--1
NRAS	0.16	0.0416	0.297	(A) C1_higt >1
XRCC5	-0.28	0.0416	0.297	(B) C1_low <--1
TSC2_PT1462	-0.27	0.0467	0.322	(B) C1_low <--1

Figura 14 – Análise da expressão de proteínas e expressão de V1C1

Análise por imuno-histoquímica da expressão das isoformas C1 e C2 da V-ATPase nos tecidos endometriais

Resultados (vide anexo 1)

5. DISCUSSÃO

A subunidade C da V-ATPase é necessária para a montagem do setor catalítico da enzima e é provável que tenha uma função específica em sua eficiência. A identificação de isoformas com semelhança no padrão de expressão com V1C1 no adenocarcinoma endometrióide, especialmente as subunidades A e H, nos permite pensar na existência de uma montagem da enzima com maior eficiência neste câncer. Ressalta-se que as subunidades C e H estão relacionadas com o acoplamento estrutural entre os dois domínios da bomba e a subunidade A, conjuntamente com a B, localiza-se no seu sítio catalítico.

A relação entre as expressões de C1 com as isoformas A, H e B2 foram constatadas tanto pelo padrão do heatmap obtido, ao serem analisados somente os casos de alta e baixa expressão de C1, quanto pela verificação da significância estatística por meio da análise das coexpressões entre C1 e estes mesmos genes da bomba. Além disso, a expressão diferencial de V1C1 conforme o maior grau histológico também foi evidenciado em relação aos genes A, H, e B2. Estas evidências nos permitem pensar na existência de associação entre expressão diferencial desses genes da V-ATPase e a gravidade da doença, reforçando a possibilidade do envolvimento desta enzima no processo oncogênico que conduz à tumores com diferentes valores prognósticos.

Os dois genes mais frequentemente alterados foram PTEN e PIK3CA, ambos verificados preponderantemente no grupo de tumores com baixa expressão de C1. Neste mesmo cenário de menor expressão, verificamos relevância estatística em relação à mutação do gene CTCF. Por outro lado, a mutação do gene TP53 foi mais frequente nos casos em que a expressão de C1 foi mais elevada (C1_high), tendo sido destaque dentre todos os genes mutados verificados no adenocarcinoma endometrióide.

O TP53 é considerado um gene supressor tumoral, uma vez que, diante de agressões ao DNA da célula, determina parada do processo de divisão celular, e, em situações de dano grave, induz à apoptose (Appel M, Selbach, T. 2015).

Pela análise no portal The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) verifica-se que a elevada expressão do gene TP53, sem mutação, mostra-se associada a um melhor prognóstico do câncer de endométrio, fato constatado pela análise da curva de sobrevivência Kaplan-Meier (Figura 15), onde pode-se depreender melhor sobrevivência nos casos de maior expressão do TP53.

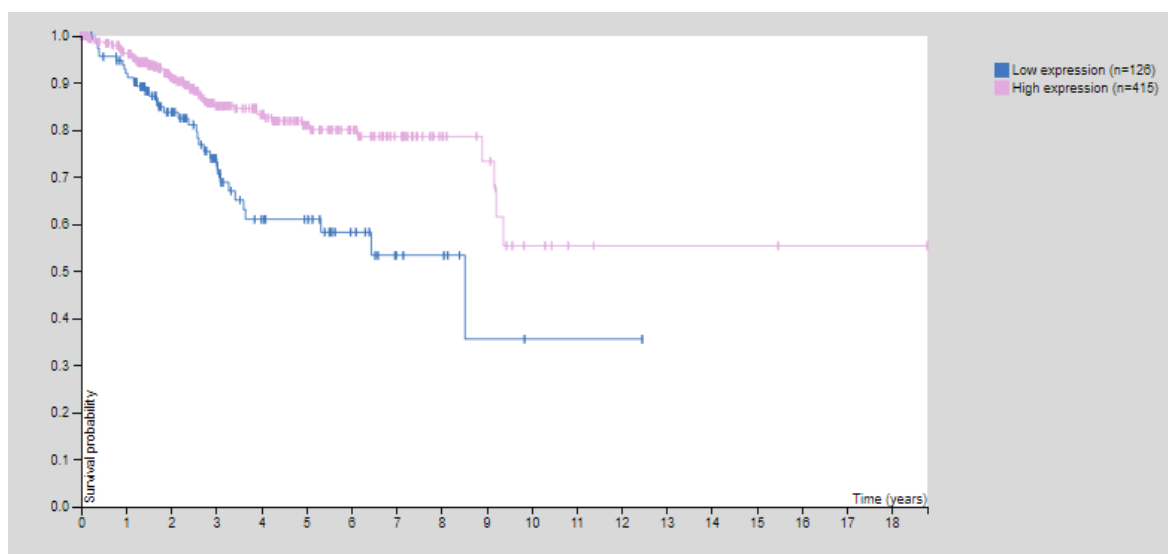


Figura 15 – Expressão do gene TP53 e curva de sobrevivência Kaplan-Meier - Protein Atlas. disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141510-TP53/pathology/endometrial+cancer>).

O TP53 encontra-se mutado em aproximadamente 50% das neoplasias humanas. As mutações determinam perda da função da proteína e inativam o efeito regulador negativo do TP53 sobre a proliferação celular, conferindo maior poder de divisão a essas células. A perda da função do gene TP53 em decorrência da sua mutação está associada, portanto, ao aumento da atividade proliferativa e à progressão tumoral (Jiao X-Dong et al. 2018).

Sabe-se que as mutações do TP53 são mais frequentes no câncer de endométrio tipo II, considerados tumores não hormônio dependentes, biologicamente mais agressivos, portanto, de pior prognóstico. A relação

significante evidenciada de mutação do TP53 com o grupo de maior expressão de V1C1 permite-nos pensar que um possível pior prognóstico esteja também relacionado com uma maior expressão da isoforma V1C1 da V-ATPase, conjuntamente com as outras isoformas da bomba que possuíram padrão de expressão semelhante, isto é, A, H e B2. Esta situação permitiria montagens de bombas em membrana plasmática mais eficientes, conduzindo ao processo oncogênico cuja evolução mostra-se desfavorável, quando há maior grau de evasão à apoptose, proliferação e invasão, como resultante da acidificação da matriz extracelular.

Por outro lado, PTEN é descrito como mais frequentemente associado ao câncer de endométrio tipo I, hormônio dependente, menos agressivo e, portanto, de melhor prognóstico. Verificamos que a maior frequência da mutação do PTEN mostrou-se associada ao grupo de menor expressão de C1, tendo sido o segundo gene mutado com maior significância estatística depois do TP53.

PTEN é um gene definido como supressor de tumor e que se mostra com mutação em um elevado número de câncer, dentre eles, o de endométrio. Fatores transcricionais, epigenéticos e pós-traducionais regulam a expressão da proteína do PTEN. EGR-1 e p53 regulam positivamente a transcrição do PTEN, enquanto o 17β estradiol é um dos fatores que regulam negativamente sua expressão. Além disso, PTEN possui atividade por meio da qual se liga à proteínas, como a p53, estabilizando-a e aumentando sua função. Essas ações do PTEN regulam funções celulares críticas, como sobrevivência, divisão, motilidade e integridade genômica celular. Portanto, PTEN é vital para a função celular normal, agindo como um importante supressor de tumor e controlando a proliferação celular descontrolada (Sur, S, Agrawal, DK, 2013).

PTEN codifica fosfatase que se opõe à ação da PI3K, reduzindo, assim, o nível de AKT ativado. AKT controla a síntese de proteínas e o crescimento celular, levando à fosforilação do mTOR. Dessa forma, o gene PTEN regula negativamente a via PI3K/Akt/mTOR, estimulando a apoptose e bloqueando a proliferação e o crescimento celular. A atividade diminuída da proteína PTEN, resultante de mutação genética, gera níveis aumentados de AKT e inibição da apoptose bem como de outros mecanismos de controle celular (Bartholomeusz et al., 2012). A

Via PI3K/AKT/mTOR está também associada à angiogênese. A ativação de PI3K pode ocorrer via mutação RAS, pelo aumento da expressão de receptores de fatores de crescimento como EGFR ou pela perda de PTEN (Lopes et al., 2015).

Destaca-se que a mutação do PTEN está mais frequentemente relacionada com o câncer de endométrio tipo I, estrogênio dependente, de menor agressividade biológica e, portanto, de melhor prognóstico. Tal relação de mutações em PTEN com o tipo de câncer de endométrio de melhor prognóstico e sua associação relevante com o grupo de baixa expressão de V1C1, permite-nos pensar que a baixa expressão desta isoforma pode estar também relacionada com tumores menos agressivos. A ativação da via PI3K/AKT/mTOR induzida pela mutação do PTEN descortina a possibilidade de que os tumores menos agressivos possuam uma via metabólica como importante promotor do seu processo oncogênico. Isso é corroborado pelo fato de que os tipos menos agressivos estarem associados com situações clínicas onde há estimulação estrogênica persistente, gerando, desta forma, controle negativo sobre a expressão do PTEN e, conseqüentemente, desregulação de funções celulares críticas, como sobrevivência, divisão e integridade do genoma celular. No câncer de mama, por exemplo, a via PI3K/AKT/mTOR é a via de sinalização mais frequentemente ativada. Sua ativação promove o crescimento do tumor e a progressão (Ciruelos, 2014). A ativação desta via mostra-se mais frequentemente nos casos de câncer de mama receptor de estrogênio positivo (ER+), tipo molecular considerado de melhor prognóstico.

Dentre as proteínas mais expressas no adenocarcinoma endometrióide, as que apresentaram as maiores significâncias estatísticas estão associadas à via de mTOR, como TSC, BAX, AKT e se relacionaram com o padrão de menor expressão de C1. Este fato corrobora com o que verificamos em relação ao PTEN, cuja mutação foi mais frequente no grupo de menor expressão de C1 e que, assim, concorre para ativação da via mTOR. O cenário demonstrado de maior ativação da via mTOR, seja via mutação do gene PTEN seja pela expressão proteica verificada, ambos associados aos casos de menor expressão de C1, corrobora com a ilação de que a baixa expressão desta isoforma esteja associada ao tipo de câncer de melhor prognóstico, isto é, o tipo I.

Por outro lado, a relação descrita na literatura em que a mutação TP53 mostra-se mais frequentemente associada ao câncer de endométrio tipo II, não hormônio dependente e de pior prognóstico, aliada à evidência constatada pelos resultados apresentados neste trabalho, de uma associação estatisticamente significativa entre a mutação desta gene com o grupo de maior expressão de V1C1, permite-nos pensar que um possível pior prognóstico esteja também relacionado com uma maior expressão da isoforma C1.

O câncer de endométrio tipo II, de pior prognóstico, não decorre da atividade estrogênica e surge a partir do endométrio normal e/ou atrófico. Nestes casos, pelos dados coletados, podemos depreender a ilação de que a gênese do câncer de endométrio de pior prognóstico possivelmente possua um gatilho genético primordial, via mutação do p53, numa situação de independência em relação à desregulação metabólica preponderantemente induzida por uma atividade hormonal anômala, situação mais frequente presente na gênese do tipo de melhor prognóstico.

Desta forma, a ativação da via mTOR, via mutação do PTEN, pode estar mais presente no processo oncogênico resultante de um ambiente celular hostil, decorrente da atividade endócrina desfavorável, determinando desregulação e reprogramação metabólica. Enquanto a gênese do câncer de endométrio considerado de pior prognóstico parece possuir no bojo da sua gênese um gatilho nuclear, onde a mutação genética do TP53 assume o protagonismo, independente do microambiente sistêmico na qual a célula se encontra.

A concepção do câncer de endométrio como uma neoplasia caracterizada em um modelo dualista de patogênese, onde existem mutações de grupos de genes independentes, tem sido descrito na literatura. O carcinoma endometrial aparentemente se desenvolve como resultado de um processo em várias etapas, onde ocorre ativação do oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, com alterações moleculares específicas e distintas entre o câncer tipo I e tipo II. Enquanto o câncer do tipo I são caracterizados por mutação de PTEN, KRAS2 e um cariótipo diplóide, o tipo II geralmente contêm mutações de TP53 e Her-2 neu e geralmente não são diplóides.

Hecht et al. consideraram que, embora o modelo entre PTEN e P53 seja correto, ele é incompleto. Descreveram vários genes candidatos neste cenário de progressão, mas ressaltaram que nem todos os genes possuem papéis evidentes em todos os casos de câncer de endométrio. Concluíram em seu trabalho que, claramente, existem outros eventos primários que conduzem a progressão e que estes poderiam ser anormalidades de genes presentes em outras vias regulatórias, associadas com os genes já descritos, ou talvez vias inteiramente novas que ainda não foram descobertas. Asseveraram que a heterogeneidade da gênese do adenocarcinoma endometrióide não foi totalmente explicado (Hecht, 2006).

Cerezo et al. ponderaram que o valor clínico dos marcadores moleculares poderia ajudar a refinar o diagnóstico e estabelecer um prognóstico mais preciso. Além disso, alguns desses biomarcadores tumorais constituem os alvos para terapias emergentes, como o trastuzumabe contra Her-2 neu e bevacizumabe contra carcinomas com superexpressão de VEGF, que estão entre as novas e promissoras terapias-alvo. Entretanto, concluíram que pesquisas adicionais são necessárias para identificar alterações moleculares e genéticas com potencial para balizar intervenções terapêuticas mais adequadas (Cerezo, 2006).

Tem sido demonstrado que as alterações genéticas moleculares envolvidas no desenvolvimento do câncer tipo I diferem do tipo II. Enquanto o tipo I mostra instabilidade de microssatélites (MI) e mutação dos genes PTEN, PIK3CA, K-RAS e b-catenina, o tipo II têm alterações do p53, perda de heterozigose em vários cromossomos, além de outras alterações moleculares, como STK15, p16, E-caderina e C-erbB2. Entretanto, Yeramian et al. decreveram que alguns carcinomas não endometrioides possivelmente surgem de adenocarcinomas endometrioides pré-existentes como resultado da progressão do tumor e que, não surpreendentemente, algumas neoplasias exibem características mistas tanto no que tange à histopatologia quanto à expressão molecular. Nesta revisão, ao discutir as alterações genéticas dos tumores de endométrio e seus precursores, os autores consideraram que compreender a patogênese em nível molecular é essencial na identificação de biomarcadores na busca de terapias direcionadas bem sucedidas (Yeramian et al, 2013).

O conceito dualista para o cancer de endométrio foi cosubstanciado pelos achados apresentados, onde as mutações diferenciais mostram-se associadas a padrões moleculares da V-ATPase que sustentam vias patogênicas distintas. A neoplasia poder-se-ia originar-se em decorrência de desregulação metabólica induzida por um ambiente hormonal adverso, que conduz à mutação de PTEN ou surgir a partir de defeito nuclear primordial, onde a mutação do P53 assume real protagonismo na oncogênese, levando a tumores de pior prognóstico. Neste cenário, os resultados obtidos em relação da expressão diferencial de V1C1 da V-ATPase em associação com o gene mutado e o grau histológico permite-nos considerar que existe claro envolvimento diferencial de isoformas específicas da V-ATPase em processos oncogênicos distintos no câncer de endométrio. Além disso, a análise da expressão da isoforma C1 representou marcador molecular eficaz na identificação do processo oncogênico que leva às neoplasias com diferentes padrões evolutivos. Esta evidencia descortina campo promissor de pesquisa para se encontrar biomarcador seguro de prognóstico do câncer de endométrio.

No que tange ao CTCF, acredita-se que seu papel principal do seja atuar na estrutura 3D da cromatina, regulando a atividade de genes e influenciando sua expressão. Além disso, o gene CTCF pode ter como ação primária atividade de isoladores, que são sequências que bloqueiam a interação entre intensificadores e promotores (Ong & Corces, 2014). Todavia, ainda não se sabe se o CTCF afeta a expressão gênica somente por meio destas atividades ou se tem alguma outra ação ainda desconhecida. Interessantemente, mutações frequentes foram detectadas nos sítios de ligação de CTCF com cohesina (outra proteína moduladora da arquitetura/atividade cromossomal/transcricional) em cânceres, exibindo uma assinatura mutacional em que predominam as mutações nos pares de bases A • T (Katainen et al., 2015). Adicionalmente, entre os alvos lisossomais especificamente processados em células mitóticas proliferativas, figura a proteína WAPL reguladora da cohesina, emergiu como uma nova proteína ligante de SQSTM1, estabelecendo a degradação lisossomal direcionada como um evento essencial para prevenir a instabilidade cromossômica (Almacellas et al., 2021).

Neste contexto, é tentador especular uma possível correlação entre a baixa expressão de C1 com uma instabilidade cromossômica causada pela inibição das funções lisossomais, dependentes da atividade da V-ATPase. Ohlsson et al.

consideraram que a mutação do gene CTCF e sua consequente inativação pode determinar perda de funções de genes reparadores do genoma, concorrendo para o quadro de desregulação metabólica e mutação de outros genes (Ohlsson et al. 2001). Este fato poderia estar relacionado com a mutação de PTEN, considerando a associação das duas mutações genéticas estarem envolvidas num quadro de desregulação metabólica, o que por sua vez se correlacionaria também com o fato de haverem sido identificadas significâncias estatísticas das mutações destes dois genes com o grupo de menor expressão de V1C1.

As maiores correlações de expressão de V1C1 foram verificadas com os genes da família SLC. Genes SLC codificam proteínas transportadoras de membranas. Dentre os genes desta grande família, o gene SLC25A32 destacou-se com uma maior significância, com valor de p de $4.07e-49$. SLC25A32 é um membro da família de transportadores mitocondriais de soluto 25. SLC25A32 transporta tetraidrofolato (THF) bem como flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) para a mitocôndria e regula o metabolismo de carbono mitocondrial e o equilíbrio redox. Embora seja conhecido que as células cancerosas requerem um metabolismo mitocondrial dependente de carbono e FAD para sustentar a proliferação celular, o papel de SLC25A32 no crescimento de células cancerosas é um campo promissor que só começou a ser explorado (Santoro et al., 2020).

A transdução de energia celular ocorre também por meio da transferência de elétrons e de hidrogênio, num processo de oxirredução ao nível de proteínas e citocromos que formam a cadeia transportadora de elétrons (CTE) das cristas mitocondriais. NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) são formas oxidadas que, ao receberem elétrons, passam a suas formas reduzidas, isto é, NADH e FADH. NAD e FAD são, portanto, coenzimas carregadoras de elétrons e H^+ através da membrana interna mitocondrial, que possuem grande importância no processo de transformação energética na mitocôndria (Figura 16).

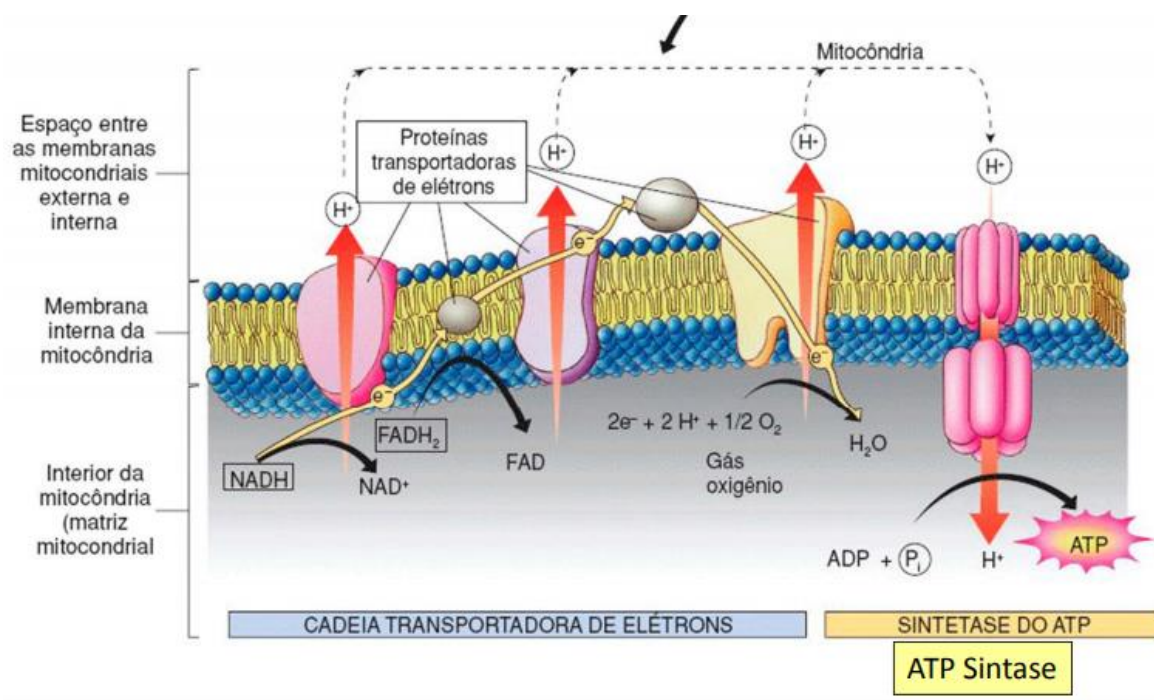


Figura 16 – Transporte de elétrons e H^+ pela membrana interna da mitocôndria e transformação energética mitocondrial.

A glutatona-dissulfeto redutase (EC 1.8.1.7), enzima que em humanos é codificada pelo gene GSR, também depende de FAD como grupo prostético para catalisar a redução de glutatona dissulfeto (GSSG) para a sua forma sulfidril (GSH), reação crítica na resistência ao estresse oxidativo e na manutenção do ambiente redutor da célula. A ativação de SLC25A32 foi demonstrada exercer papel relevante na respiração celular via complexo II, indução de reativo Espécies de oxigênio (ROS) e produção de glutatona reduzida (GSH), ambos processos dependentes de FAD, fundamentais para a proliferação celular tumoral (Santoro et al., 2020).

Outro eixo de integração entre SLC25A32 e a carcinogênese pode ser traçado por intermédio do metabolismo monocarbonado (1C), sob controle de THF, outra molécula transportada por SLC25A32, com influência direta sobre a síntese de nucleotídeos e o controle epigenético da proliferação celular. Uma das conexões plausíveis seria via enzima 10-formiltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH), que catalisa a conversão dependente de $NADP^+$ de 10-formiltetrahydrofolato (10-formyl-THF) em CO_2 e tetrahydrofolato (THF). A coenzima 10-formil-THF está envolvida

em muitos processos metabólicos celulares, incluindo a produção de purinas e pirimidinas necessárias à biossíntese de DNA e RNA. Desta forma, células em acelerado processo mitogênico e elevada atividade metabólica, como as células tumorais, têm mais necessidade do 10-formil-THF, precursor de THF (Spinosa, 2006), de tal forma que vários estudos têm sugerido que FDH poderia regular a biossíntese de ácidos ribonucleicos através do controle do nível de 10-formil-THF, o substrato da enzima.

A estrutura básica da FDH sugere uma evolução molecular a partir de um produto de fusão de três genes, originalmente não relacionados, configurando três domínios distintos. O domínio C-terminal parece ter se originado de genes relacionados à aldeído desidrogenase, sendo este domínio capaz de oxidar aldeídos de cadeia curta em ácidos correspondentes. Semelhante às classes 1 e 2 das aldeído desidrogenases, este domínio existe como um tetrâmero, o que define a estrutura oligomérica da holoenzima. Os dois domínios catalíticos são conectados pelos resíduos de aminoácidos de 311 a 399, numa sequência polipeptídica homóloga estrutural e funcional de proteínas transportadoras dotadas de grupo prostético 4'-fosfopanteteína. O mecanismo catalítico da FDH é um acoplamento de duas reações sequenciais, uma hidrólise seguida por uma desidrogenação do radical formil com a liberação de CO₂ (Krupenko, 2009). Embora várias atividades tenham sido atribuídas a enzima FDH, seu papel no metabolismo 1C folato-dependente, ainda permanece pouco compreendido. Dentre as funções da FDH tem sido proposta: a inibição da biossíntese de purinas pela depleção do pool de 10-formil-THF; a manutenção das concentrações de folato celular sob a forma de THF; e a estimulação da síntese de metabólitos monocarbonados ativada por THF, via enzimas dependentes deste cofator (Anguera et al., 2006).

Pesquisadores norte-americanos, em 2002, propuseram que a regulação negativa da FDH em neoplasias pode representar importante via de incremento da proliferação celular (Krupenko e Oleinik, 2002). O mecanismo proposto sugere que a depleção desta enzima resulte num aumento do pool de 10-formil-THF disponível para síntese de nucleotídeos, enquanto uma superexpressão ou ativação de FDH resultaria numa diminuição da concentração do 10-formil-THF intracelular, resultando em diminuição das atividades proliferativas devido a restrição de nucleotídeos. Em 2010, os mesmos autores constataram que o gene

ALDH1L2 é o homólogo mitocondrial da 10-formiltetraidrofolato desidrogenase (mtFDH). Em contraste com a enzima citosólica (FDH), que não é detectável em células cancerosas, demonstraram por PCR convencional e em tempo real e, também, por Western blot a presença de mtFDH em várias linhagens de células tumorais humanas. Verificaram, ademais, por meio da análise dos genomas de diferentes espécies que a enzima mitocondrial é um produto evolutivo quando comparada à enzima citosólica. Propuseram, desta forma, que esta enzima mitocondrial pudesse ser uma fonte provável de produção de CO₂ a partir de 10-formyl-THF na mitocôndria e desempenharia um papel essencial na distribuição de metabólitos 1C entre os compartimentos citosólico e mitocondrial da célula (Krupenko et al., 2010).

Em nosso estudo verificamos correlação significativa entre as elevadas expressões da isoforma C1 da V-ATPase com a expressão do gene que codifica a proteína SLC25A32, transportador mitocondrial de THF e FAD. Este fato sugere a possibilidade de que no câncer de endométrio, tal como ocorre em outros cânceres, possa haver uma regulação negativa da enzima FDH, com acúmulo de 10-formyl-THF e consequente depleção de THF citoplasmático, desencadeando uma regulação positiva compensatória da expressão do transportador mitocondrial de THF, a fim de prover a conservação da oferta do substrato 10-formil-THF na mitocôndria, acaba por ativar a matriz energética, por meio da efetiva disponibilidade de FAD, que permita sustentar a elevada demanda por ATP presente na intensa proliferação neoplásica.

Pela análise do TCGA no cBioPortal, detectamos também a existência de elevada expressão gênica do ALDH1L2 (mtFDH) marcadamente no grupo de maior expressão V1C1 (C1_high>1), com grande significância estatística (p value: 2.542e-6) – Figura 17. Esta situação reforça a ilação de que no câncer de endométrio a elevada expressão da isoforma V1C1 da V-ATPase se correlaciona também com maior atividade da célula tumoral na produção da variante mitocondrial da enzima FDH (mtFDH), ativando a formilação de metionina-tRNA, um processo essencial para o início da tradução de proteínas mitocondriais e de especial relevância para a proliferação tumoral em vários tipos de cânceres. Tal atividade também eleva a demanda transportador de THF na membrana

mitocôndrial, isto é, SLC25A32, destacadamente se correlacionando numa via metabólica em que há superexpressão conjunta com a isoforma V1C1.

Desta forma, permitimo-nos a ilação de que no câncer de endométrio de pior prognóstico, que cursa com evidente superexpressão da isoforma C1 da V-ATPase, exista clusterização de moléculas, igualmente superexpressas, que conduzem via metabólica presente num cenário de maior atividade proliferativa. Este fato descortina a possibilidade de identificação de possíveis biomarcadores úteis ao processo de refino diagnóstico quanto ao potencial evolutivo da neoplasia que conduz a um pior prognóstico e, assim, obtenção de maior precisão diagnóstica e terapêutica no câncer de endométrio.

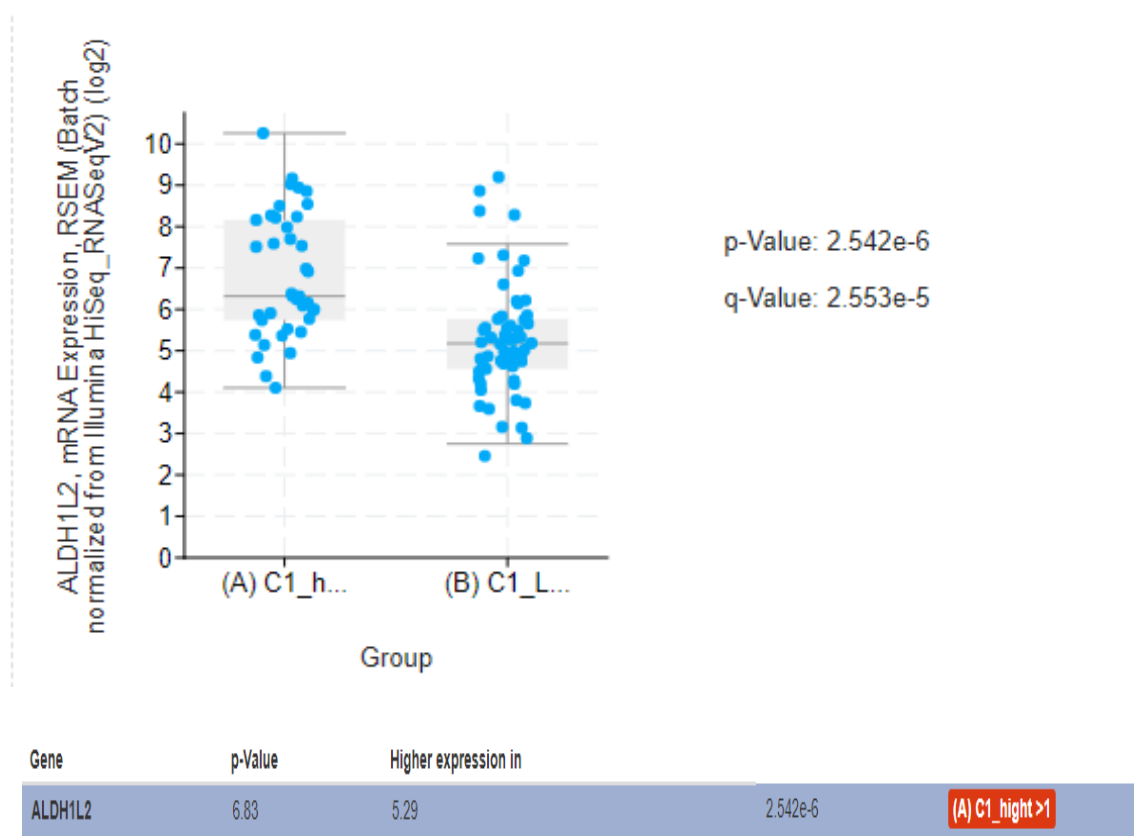


Figura 17 – Expressão gênica de ALDH1L2 nos grupos de maior e menor expressão de V1C1 no adenocarcinoma de endométrio.

6. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, concluímos que a verificação da expressão da isoforma C1 da V-ATPase, aliada à análise do padrão molecular de clusterização, pode subsidiar a identificação de subtipos de adenocarcinoma de endométrio com distinta agressividade biológica. Este fato, torna a análise da isoforma C1 foco promissor na implementação de estudos subsequentes e, se confirmado, permitirá a utilização da análise da sua expressão numa ferramenta útil à prática clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almacellas E, et al. Lysosomal degradation ensures accurate chromosomal segregation to prevent chromosomal instability, *Autophagy*. 2021; 17:3, 796-813. DOI: 10.1080/15548627.2020.1764727
- Ambros RA, Kurman RJ. Identification of patients with stage I uterine endometrioid adenocarcinoma at high risk of recurrence by DNA ploidy, myometrial invasion, and vascular invasion. *Gynecologic Oncology*. 1992; 45(3): 235-9. DOI: 10.1016/0090-8258(92)90296
- American Cancer Society - ACS. Cancer facts & figures 2010. Atlanta (USA): American Cancer Society; 2010.
- Anguera MC. et al. Regulation of folate-mediated one-carbon metabolism by 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2006; 281(27):18335-42. DOI: 10.1074/jbc.M510623200
- Appel M; Selbach T. Molecular biology in endometrial carcinoma: a review. *Femina*. 2015; 43 (1): 37-43.
- Bartholomeusz C, et al. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy. *Targets*. 2012; 16(1): 121-130.
- Bray F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68 (6): 394-424.
- Boyle, P; Levin, B. World cancer report 2008. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2008.
- Canadian Cancer Society. Canadian cancer statistics 2017. Toronto, 2017.

- Cerezo L. et al. Molecular alterations in the pathogenesis of endometrial adenocarcinoma. Therapeutic implications. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8(4):231-41. DOI: 10.1007/BF02664933
- Ciruelos GEM. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 2014; 40 (7): 862-871.
- Cotter K. et al. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends in Biochem Sci.* 2015, (10): 611-22. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.005
- Couto-Vieira J. et al. Multi-cancer V-ATPase molecular signatures: A distinctive balance of subunit C isoforms in esophageal carcinoma. *EBioMedicine* 51 (2020) 102581. DOI: [10.1016/j.ebiom.2019.11.042](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.042)
- Ferlay, J. et al. GLOBOCAN 2012, Cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2012. (IARC CancerBase). Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
- FIGO Committee on Gynecologic Oncology - FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2014.
- Hecht, JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (29): 4783-91.
- Holliday LS, et al. Vacuolar H⁺-ATPase: An Essential Multitasking Enzyme in Physiology and Pathophysiology. *New Journal of Science.* 2014. DOI: 10.1155/2014/675430
- INCA 2020. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. 2019.
- Jiao X-Dong, et al. The prognostic value of TP53 and its correlation with EGFR mutation in advanced nonsmall cell lung cancer, an analysis based on cBioPortal data base, *Lung Cancer.* 2018; 123:70-75. DOI: [10.1016/j.lungcan.2018.07.003](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.003)
- Katainen R, et al. CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer. *Nat Genet.* 2015; 47, 818–821. DOI: 10.1038/ng.3335

- Kawauchi K, et al. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 2008; May; 10(5):611-8. DOI: 10.1038/ncb1724
- Krupenko NI, et al. ALDH1L2 is the mitochondrial homolog of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2010; 285(30): 23056-63.
- Krupenko SA. FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism. *Chemico-biological interactions*, 2009: 178(1-3), 84–93. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.09.007
- Krupenko SA, Oleinik NV. 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth Differ.* 2002;13(5): 227-36.
- Lee YY, et al. Proton pump inhibitors enhance the effects of cytotoxic agents in chemoresistant epithelial ovarian carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 6(33): 35040-50. DOI: 10.18632/oncotarget.5319.
- Li YP, et al. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Genet.* 1999; 23(4): 447-51. DOI: 10.1038/70563
- Liu T, et al. Multifaceted Regulation of PTEN Subcellular Distributions and Biological Functions. *Cancers.* 2019. 11(9): 1247. DOI: 10.3390/cancers11091247
- Long X, et al. Enhanced expression of p53 and apoptosis induced by blockade of the vacuolar proton ATPase in cardiomyocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101(6), 1453–1461. DOI: 10.1172/JCI345
- Lopes GL, et al. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J. Bras. Pneumol.* 2015; 41 (4): 365-375.
- Ohlsson, R. et al. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 2001; 17 (9): 520-527.

- Ong CT, Corces VG. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nature reviews. Genetics*. 2014; 15(4): 234–246. DOI:10.1038/nrg3663
- Parrales, A., Iwakuma, T. p53 as a Regulator of Lipid Metabolism in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17, 2074. DOI: 10.3390/ijms17122074.
- Protein Atlas. disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141510-TP53/pathology/endometrial+cancer>
- Sanderson PA. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum Reprod Update*. 2017; 23(2): 232-54.
- Santoro V, et al. SLC25A32 sustains cancer cell proliferation by regulating flavin adenine nucleotide (FAD) metabolism. *Oncotarget*. 2020; 11 (8): 801-812.
- Singh G, Chan AM. Post-translational modifications of PTEN and their potential therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11(5): 536-47. DOI:10.2174/156800911795655930.
- Stewart, BW; Wild CP. World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.
- Stransky, et al. The Function of V-ATPase in Cancer. *Physiol Rev*. 2016; 96(22): 1071-91. DOI: 10.1152/physrev.00035.2015
- Sur S, Agrawal DK. PTEN: Structure, Mechanisms-of-Action, Role in Cell Signaling and Regulation. Elsevier, 2013: p 1-50.
- Spinosa, HS, Górnjak, SL, Bernardi, MM. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2006.
- Webb, BA, et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(9): 671-7. DOI: 10.1038/nrc3110
- Yeramian A, et al. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene*. 2013; 32(4):403-13.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados preliminares da análise por imuno-histoquímica da expressão das isoformas C1 e C2 da V-ATPase nos tecidos endometriais.

Anexo 2: Planilha das amostras para imuno-histoquímica.

Anexo 3: Planilha lâminas e resultados da imuno-histoquímica.

Anexo 4: Autorização do HEAA para a pesquisa no LBCT/CBB/UENF

Anexo 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 6: Aprovação do CEP local

Anexo 1

Análise por imuno-histoquímica da expressão das isoformas C1 e C2 da V-ATPase nos tecidos endometriais.

Resultados preliminares

A imunopositividade para a isoforma C1 foi exclusivamente citoplasmática em todos tipos histológicos analisados. A marcação foi fraca e mais predominante na região basal das células em tecidos normais e mais apical em tecidos hiperplásicos, enquanto que tecidos tumorais apresentaram uma marcação difusa e mais intensa, com imunopositividade em toda a área tumoral. O estroma foi negativo ou muito pouco marcado em todos os casos (figura 2 e 3).

Tecidos endometriais normais apresentaram, de forma geral, uma imunomarcação para C2a,b mais intensa e homogênea do que os tecidos de hiperplasia, pólipos e tumor. Tecidos hiperplásicos apresentaram uma marcação mais difusa e aparentemente mais na região apical das células enquanto que tecidos normais apresentaram marcação intensa tanto na região apical quanto basal das células (figura 4 e 5).

A marcação foi predominantemente citoplasmática na maioria dos casos, no entanto, algumas células de tecidos tumorais apresentaram marcação predominante na membrana plasmática (figura 4a). Estes dados são particularmente interessantes, pois a V-ATPase é localizada em endomembranas com endossomos, lisossomos e complexo de Golgi. Esta enzima está ativamente expressa na membrana plasmática apenas de algumas células especializadas como, osteoclasto, células renais e células tumorais, onde exercem um papel importante na acidificação do meio extracelular. Em células tumorais, V-ATPase expressa na membrana plasmática tem sido associada com a ativação de metaloproteinases ácidas que degradam a matriz extracelular, favorecendo a migração e invasão das células tumorais (Forgacs 2007, Cipriano, Wang et al. 2008). Assim, é possível que áreas com maior expressão da V-ATPase na membrana plasmática possam apresentar maior potencial invasivo, o que não foi possível

avaliar nesse estudo uma vez que a maioria dos nossos casos de tumor eram de biópsias e não peças cirúrgicas.

Além disso, uma imunomarcção nuclear também foi observada para a C2a,b em alguns casos de tumor e em muitas células do estroma de células normais e tumorais (figura 4 e 5). A presença da V-ATPase em membranas nucleares foi relatada apenas uma vez, em um estudo recente que utilizou como modelo células tumorais de próstata (Santos, Martinez-Zaguilan et al. 2016).

Nossos dados demonstram um padrão diferencial de expressão de isoformas C1 e C2a,b entre tecidos endometriais normais, hiperplásicos, pólipos e tumores, abrindo perspectiva para novos estudos confirmatórios com um número maior de casos e para estudos que possam avançar nas análises desses marcadores como preditores tanto para progressão das lesões precursoras quanto para o prognóstico da doença.

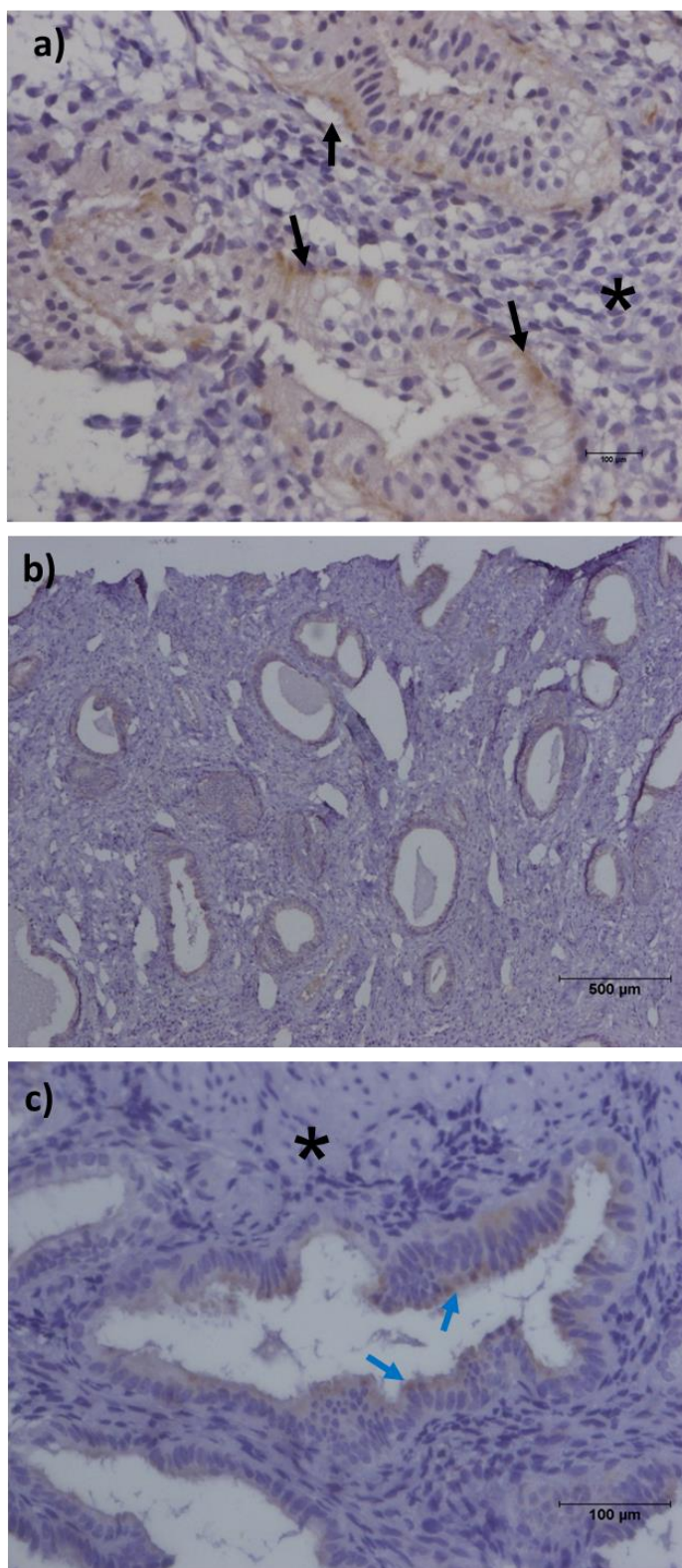


Figura 2: Fotomicrografias representativas de imunomarcção para isoforma C1 em casos de a) endométrio normal, b) pólipó e c) hiperplasia. Setas pretas indicam exemplos de marcação predominante na parte basal das células, setas azuis indicam exemplos de marcação mais na parte apical das células e asteriscos indicam exemplos de região estromal sem marcação.

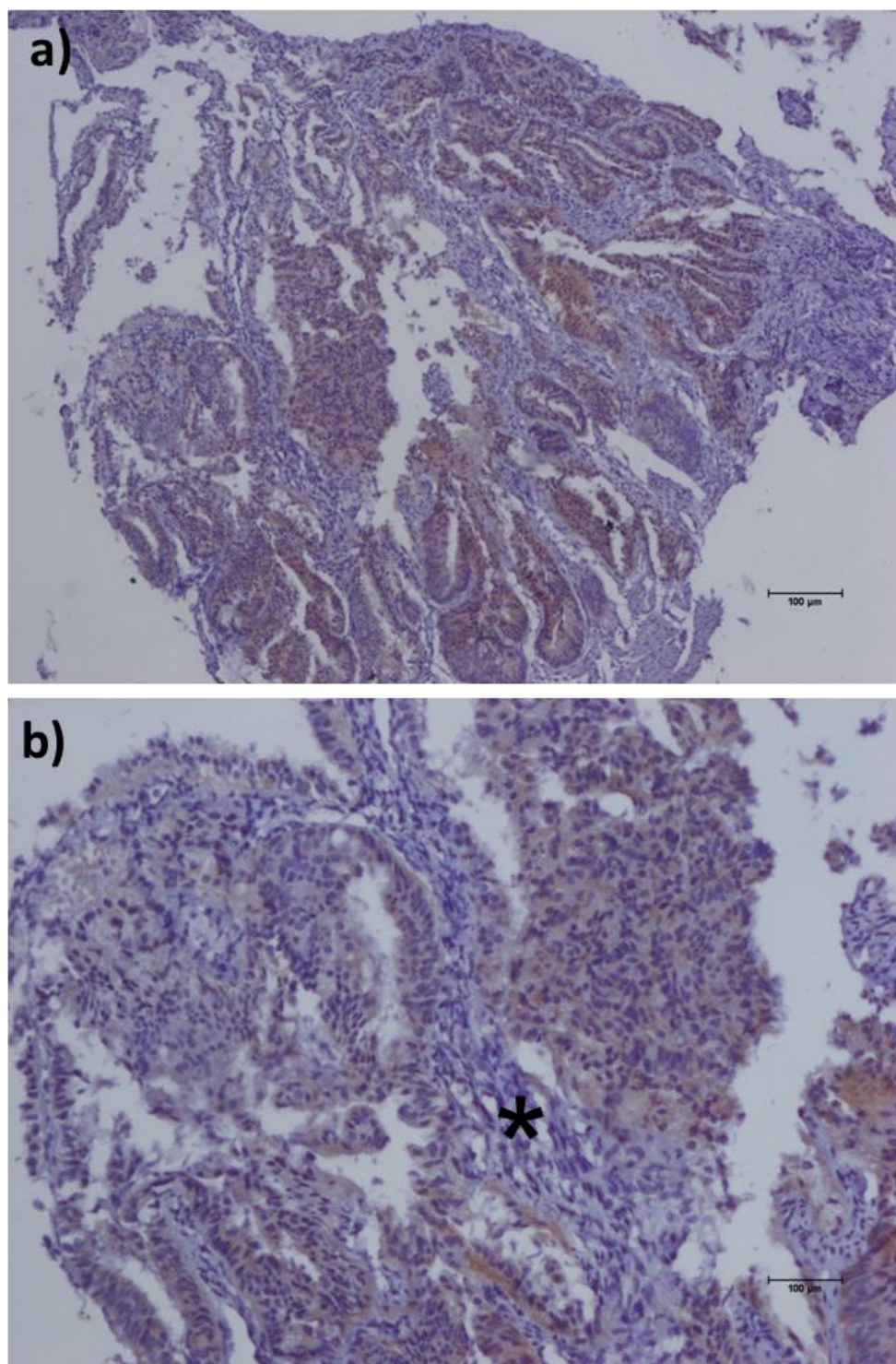


Figura 3: Fotomicrografias representativas de imunomarcção para isoforma C1 em casos de adenocarcinoma de endométrio. Marcação citoplasmática, difusa e em toda área tumoral, com estroma negativo (asterisco).

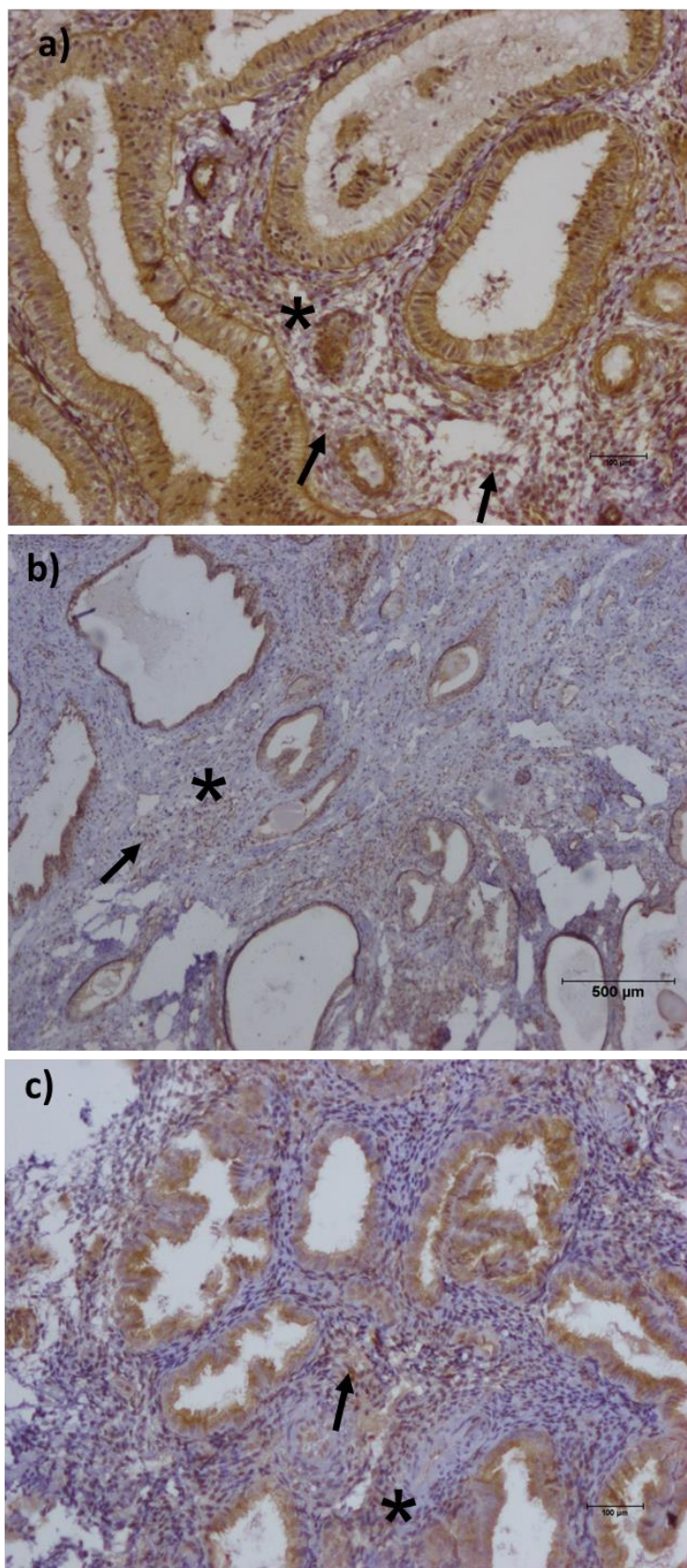


Figura 4: Fotomicrografias representativas de imunomarcção para isoforma C2a,b em casos de a) endométrio normal, b) pólipo e c) hiperplasia. Setas indicam exemplos de núcleos imunopositivos e asteriscos indicam exemplos de marcação em região estromal.

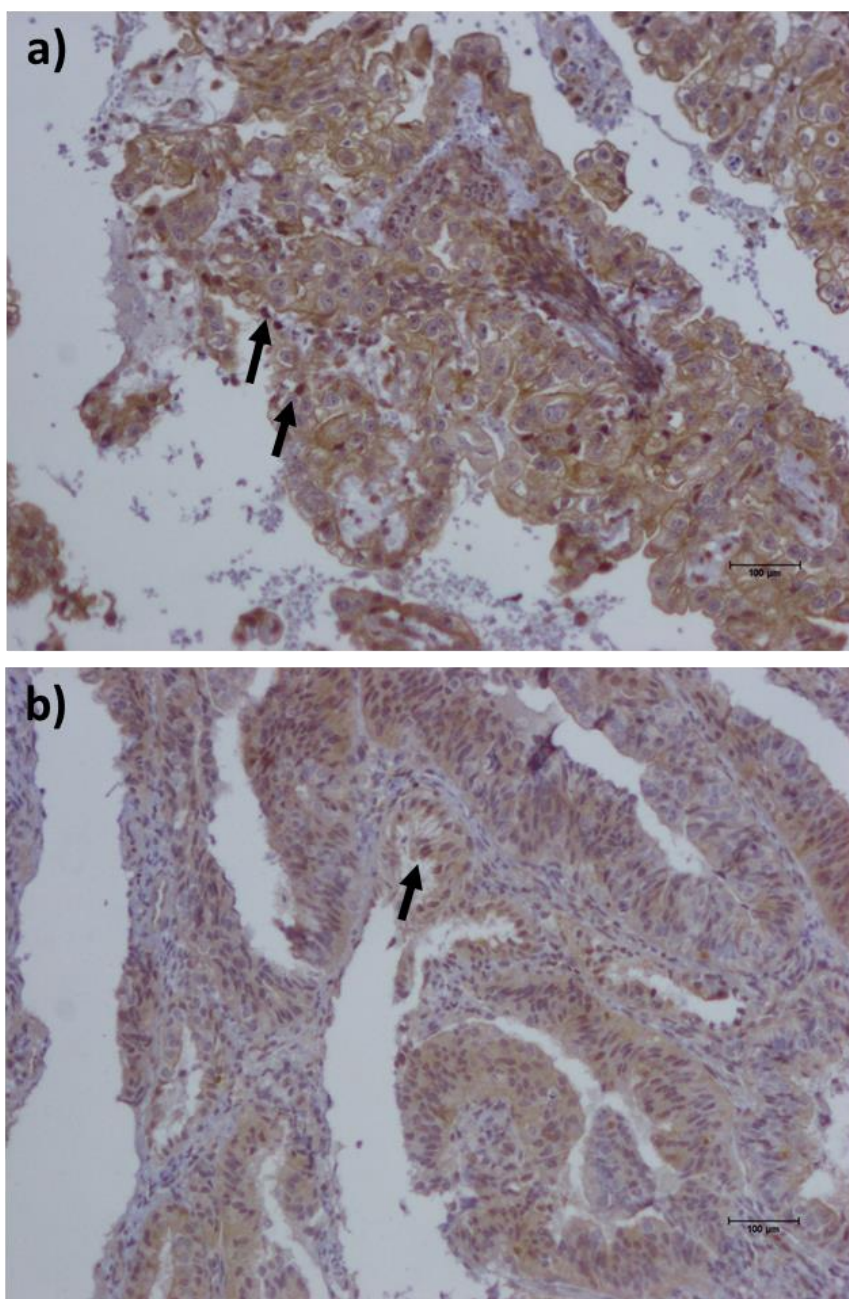


Figura 5: Fotomicrografias representativas de imunomarcação para isoforma C2a,b em casos de adenocarcinoma de endométrio. Ambas imagens são de um tumor de uma mesma paciente, onde pode-se observar a heterogeneidade da imunomarcação dependendo da área tumoral. a) imunomarcação predominante na membrana plasmática e b) predominante no citoplasma. Setas indicam exemplos de núcleos imunopositivos.

Anexo 2

Planilha das amostras para imuno-histoquímica

PLANILHA DOS CASOS PARA IMUNOHISTOQUÍMICA															
INICIAIS	LAUDO	IDADE	GESTA	PARA	ABORTO	PN	PC	LT	MENOPAUSADA	SUA	DM	OBESIDADE	HAS	TH	BLOCO
IQP	NORMAL	30	1	0	1	0	0	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	625668
ACF	NORMAL	61	6	6	0	6	0	SIM	SIM	NÃO	NÃO	MODERADA	SIM	NÃO	633593
ASV	NORMAL	34	3	3	0	1	2	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	LEVE	NÃO	NÃO	641107
EBS	NORMAL	37	0	0	0	0	0	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	640051
MPA	NORMAL	56	2	2	0	2	0	SIM	SIM	NÃO	NÃO	MODERADA	SIM	NÃO	647420
MPG	NORMAL	47	3	3	0	0	3	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	LEVE	NÃO	SIM	639721
MHFL	ADENOCARCINOMA	54													409391
DSS	ADENOCARCINOMA	69	0	0	0	0	0	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	369669
MLS	ADENOCARCINOMA	58	4	2	2	2	0	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	416164
GQS	ADENOCARCINOMA	83	1	1	0	1	0	NÃO	SIM	SIM	SIM	LEVE	SIM	NÃO	374103
RFG	ADENOCARCINOMA	65	3	3	0	2	1	SIM	SIM	SIM	SIM	LEVE	SIM	NÃO	442170
IFSM	ADENOCARCINOMA	56	2	2	0	0	2	SIM	SIM	SIM	SIM	LEVE	SIM	NÃO	464115
RCAP	ADENOCARCINOMA	56	0	0	0	0	0	NÃO	SIM	SIM	SIM		SIM		609815
JFM	ADENOCARCINOMA	34													365943
AHP	ADENOCARCINOMA	36	5	5				SIM	NÃO		NÃO		NÃO		342357
AMSS	ADENOCARCINOMA	69	2	2					SIM		SIM		SIM		375001
ARM	ADENOCARCINOMA	55	0	0	0	0				SIM	NÃO		SIM		394305
EGM	ADENOCARCINOMA	56	3	3	0			SIM	SIM		NÃO		SIM		400793
CBA	ADENOCARCINOMA	48	4	3	1						NÃO		NÃO		392211
RPS	ADENOCARCINOMA	68							SIM		NÃO		SIM		464813
MMS	ADENOCARCINOMA	77							SIM						360261
TCCG	ADENOCARCINOMA	63							SIM		SIM		SIM		408522
MGMS	HIPERPLASIA														438937
MIS	HIPERPLASIA	68													449663
CSS	HIPERPLASIA	40	3	2	1	2	0	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	445863
MGGR	HIPERPLASIA	87	8	5	3	5	0	NÃO	SIM	SIM	NÃO	MODERADA	SIM	NÃO	549612
VCCC	HIPERPLASIA	64	3	3	0	1	2	SIM	SIM	SIM	NÃO	MODERADA	SIM	NÃO	379310
MMA	HIPERPLASIA	75	4	4	0	4	0	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	395136
RGR	HIPERPLASIA	60	4	4	0	3	1	SIM	SIM	SIM	NÃO	LEVE	SIM	NÃO	372619
CMO	PÓLIPO	58	2	2	0	2	0	SIM	SIM	NÃO	NÃO	LEVE	NÃO	NÃO	672740
GS	PÓLIPO	54	3	3	0	3	0	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MODERADA	SIM	NÃO	674262
NC	PÓLIPO	46	3	3	0	3	0	NÃO	SIM	SIM	NÃO	LEVE	NÃO	NÃO	675075
TRG	PÓLIPO	60	2	2	0	0	2	SIM	SIM	NÃO	NÃO	LEVE	SIM	NÃO	615759
MAPC	PÓLIPO	>55	1		0	0	1	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MODERADA	SIM	NÃO	605993
NSS	POLIPO	>55	>2					NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	LEVE	SIM	579433
MMG	POLIPO	36-40	0					NÃO	NÃO	SIM	NÃO	MODERADA	NÃO	NÃO	616653
RSM	POLIPO	>55	2				SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	LEVE	NÃO	NÃO	613419
CPMP	POLIPO	41-50	2				SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	LEVE	NÃO	NÃO	607305
AOL	POLIPO	41-50	0					NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	601119
DGM	POLIPO	>55	>2					SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	LEVE	SIM	593510
MITC	POLIPO	>55	0					NÃO	NÃO	SIM	SIM	MODERADA	SIM	NÃO	602574
ACS	POLIPO	41-50	>2					NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	MODERADA	NÃO	588218
VLMS	POLIPO	40-50	2					SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	602579

Anexo 3

Planilha lâminas e resultados IHQ

CAIXA MADEIRA		
ABDALLA		ADENOCARCINOMA
Anticorpo C2		
Lâmina	Laudo	Resultado IHQ
controle +		
controle -		
375001	ADENOCARCINOMA	
464813	ADENOCARCINOMA	
360261	ADENOCARCINOMA	
408522	ADENOCARCINOMA	
400793	ADENOCARCINOMA	
392211	ADENOCARCINOMA	
342357	ADENOCARCINOMA	
396155	ADENOCARCINOMA	
365943	ADENOCARCINOMA	
394305	ADENOCARCINOMA	
Anticorpo C1		
Lâmina	Laudo	Resultado IHQ
controle +		
controle -		
375001	ADENOCARCINOMA	
464813	ADENOCARCINOMA	
360261	ADENOCARCINOMA	
408522	ADENOCARCINOMA	
400793	ADENOCARCINOMA	
392211	ADENOCARCINOMA	
342357	ADENOCARCINOMA	
396155	ADENOCARCINOMA	
365943	ADENOCARCINOMA	
394305	ADENOCARCINOMA	

CAIXA CINZA		
ABDALLA		PÓLIPO
Anticorpo C2		
Lâmina	Laudo	Resultado IHQ
controle +		
controle -		
579433	POLIPO	
616653	POLIPO	
2812885	POLIPO	
613419	POLIPO	
851303	POLIPO	
607305	POLIPO	
6011992	POLIPO	
605993	PÓLIPO	
5882181	POLIPO	
593510	POLIPO	
5882183	POLIPO	
6011991	POLIPO	
602574	POLIPO	
602574 2	POLIPO	

Anticorpo C1		
Lâmina	Laudo	Resultado IHQ
controle +		
controle -		
579433	POLIPO	
616653	POLIPO	
2812885	POLIPO	
613419	POLIPO	
851303	POLIPO	
607305	POLIPO	
6011992	POLIPO	
605993	PÓLIPO	
5882181	POLIPO	
593510	POLIPO	
5882183	POLIPO	
6011991	POLIPO	
602574	POLIPO	
602574 2	POLIPO	

CAIXA PRETA		
ABDALLA		Variados
Anticorpos C1 e C2		
Lâmina	Laudo	Resultado IHQ
controle		
+		
controle -		
549612	HIPERPLASIA	
449663	HIPERPLASIA	
445863	HIPERPLASIA	
640051	NORMAL	
369669	ADENOCARCINOMA	
464115	ADENOCARCINOMA	
639721	NORMAL	
675152	HIPERPLASIA	
625668	NORMAL	
641107	NORMAL	
633593	NORMAL	
438937	HIPERPLASIA	
675075	PÓLIPO	
674262	HIPERPLASIA	
416164	ADENOCARCINOMA	
672740	PÓLIPO	
409391	HIPERPLASIA	
379310	HIPERPLASIA	
442170	ADENOCARCINOMA	

Anexo 4**Autorização HEAA para a pesquisa no LBCT**

Campos dos Goytacazes, 03 de maio de 2018

Do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia

À Direção do HEAA

Dr. José Manuel Correia Moreira

Prezado diretor

O Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital Escola Álvaro Alvim (HEAA), ligado a Faculdade de Medicina de Campos, encontra-se a disposição para participar de projetos de pesquisa em conjunto com o Laboratório de Biociência e Biotecnologia da UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense), visando análise de biologia molecular, podendo retirar e transportar blocos de parafina arquivados de pacientes com diagnóstico histopatológico de endométrio normal, com patologia benigna e maligna.

Dra. Maria Auxiliadora Peixoto Peçanha
Responsável técnica

Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia - HEAA

Anexo 5**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL**

Nome da paciente: _____

Sexo: F () M () Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Documento de identidade: Nº _____ UF: _____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ CEP: _____

Contatos: Telefone Fixo: _____ Celular: _____

Responsável Legal: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Parentesco: _____

Documento de identidade: Nº _____ UF: _____

Endereço: _____

Complemento: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ CEP: _____

Contatos: Telefone Fixo: _____ Celular: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título da pesquisa: ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DA p16 NO ENDOMÉTRIO NORMAL, NA PATOLOGIA BENIGNA E NO ADENOCARCINOMA DE ENDOMÉTRIO.

Pesquisador: ARNOLDO ROCHA FACANHA

Cargo: Professor/Pesquisador da UENF

CPF: 357.674.563-72

Inscrição no conselho:

Avaliação do risco da pesquisa: nenhum risco

Duração da pesquisa: 1 ano

EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR A PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

O objetivo desta pesquisa consiste em analisar o comportamento de uma proteína chamada P16 presente nas células para verificar eventuais diferenças nas diversas anormalidades do endométrio (mucosa de revestimento do útero) que podem evoluir para o câncer. O material obtido por biópsia do endométrio ou da cirurgia que foi realizada (histerectomia) é enviado ao laboratório de anatomia patológica do HEAA, onde é preparado e colocado em um bloco contendo parafina. Deste bloco, são retiradas finas fatias dele por meio de um aparelho chamado micrótomo. Essas finas fatias são colocadas em lâminas com corantes para se fazer o diagnóstico histopatológico. O seu diagnóstico já foi feito e o laudo foi entregue a você, tendo seu médico já analisado o resultado e instituído as condutas necessárias ao caso. Depois de realizar este diagnóstico histopatológico feito pelo patologista, normalmente costuma sobrar material no bloco de parafina que foi citado acima. Este bloco fica arquivado no laboratório para eventual análise, estudo ou revisão posterior, que no seu caso não foi necessário. Este material da biópsia de endométrio ou peça cirúrgica (histerectomia) que está arquivado no laboratório do HEAA em um bloco de parafina, que não é mais necessário para seu caso, pois já foi adequadamente feito o diagnóstico, já tendo assim cumprido seu objetivo, pode ajudar bastante algumas pesquisas e este é o caso desta em questão. Nesta pesquisa, buscaremos o seu bloco de parafina arquivado para, a partir dele, ser retirado uma pequena parte do material contido nele para se fazer um teste chamado de imunohistoquímica no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF e o restante do material permanecerá arquivado no laboratório do HEAA. Este exame de imunohistoquímica permitirá analisar o comportamento biológico de uma proteína chamada P16 nas células que contém a anormalidade relacionada com o seu caso. Não será realizado nenhum outro procedimento em você, não havendo, portanto, nenhum desconforto, risco, prejuízo ou dano. Seu diagnóstico não será alterado e seu tratamento não será prejudicado, modificado ou descontinuado. Portanto, você continuará sendo tratada normalmente no HEAA. Espera-se, com esta pesquisa, verificar se a análise desta proteína, a P16, quando somada ao diagnóstico histopatológico da biópsia, pode funcionar como um marcador (exame) que permita diagnósticos mais precisos, tratamentos mais eficazes e, principalmente, uma melhor compreensão do real potencial dos diferentes tipos de lesões de evoluírem para o câncer. Desta forma, os programas de prevenção e de diagnóstico precoce do câncer de endométrio poderão se tornar melhores e, possivelmente, num futuro próximo, esta pesquisa poderá beneficiar outras mulheres com diagnóstico igual aquele foi feito em você.

GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Convidamo-la para participar desta pesquisa, deixando claro que:

- o pesquisador ou seus assessores estarão sempre disponíveis e acessíveis para esclarecer qualquer dúvida a respeito da pesquisa. Para tanto, será fornecido os horários e o local no LBCT/UENF e no HEAA onde poderá entrar em contato para resolver e dirimir eventuais dúvidas.
- este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem a necessidade de dar qualquer justificativa, bastando, para tanto, requer ao pesquisador ou seus assessores a sua revogação. O fato de optar por não mais participar da pesquisa não acarretará nenhum prejuízo a sua assistência médica e seu tratamento será normalmente continuado.
- conforme explicado acima, esta pesquisa não impõe nenhum risco a sua saúde, nem prejuízo ao seu tratamento, pois não será realizado nenhum novo procedimento. Apenas será utilizado parte do material da biópsia que foi realizada e que encontra-se arquivado no laboratório do HEAA. O objetivo desta biópsia realizada já foi alcançado pela conclusão diagnóstica, relatada no laudo histopatológico em sua pose.
- fica assegurado o direito a confidencialidade, sigilo e privacidade do seu caso.
- esta pesquisa será submetida a Comissão de Ética em Pesquisa para aprovação.

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) do conteúdo deste documento e ter tido plena oportunidade de conversar com o pesquisador ou seus assessores para esclarecer todas as minhas dúvidas, declaro estar suficientemente informada e, diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar desta pesquisa.

Assinatura da participante

Declaro que obtive de forma voluntária o Consentimento da participante desse estudo.

Pesquisador

DADOS DOS RESPONSÁVEIS TÉCNICOS DA PESQUISA

Pesquisador principal: Prof. ARNOLDO ROCHA FACANHA
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – CBB/UENF
Endereço: Avenida Alberto Lamego, 2000 Parque Califórnia LBCT/UENF
Campos dos Goytacazes - RJ. Telefone: (22) 2748-6474
Segunda-feira a sextas-feiras das 08:00 às 12:00h
Endereço eletrônico: arnoldo@uenf.br

Pesquisador médico: Dr. Abdalla Dib Chacur
Hospital Escola Álvaro Alvim
Endereço: Rua Barão da Lagoa Dourada, 409 – sala 9
Segunda-feira a sexta-feira das 8:00 às 12:00h
Campos dos Goytacazes – RJ. Telefone: (22) 27266700—
Endereço eletrônico: www.heaa.com.br

Comissão de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina de Campos/Fundação Benedito Pereira Nunes
Endereço: Avenida Dr. Alberto Torres, 217
Telefone: (22) 2101-2948

Segunda-feira as sextas-feiras das 08:00 às 12:00h
Endereço eletrônico: cepfmc@fmc.br

Obs.: Este documento possui duas vias, sendo uma entregue a participante, devidamente assinadas e rubricadas pela participante e pelo pesquisador.

Anexo 6

Aprovação do CEP local

FACULDADE DE MEDICINA DE
CAMPOS/FUNDAÇÃO
BENEDITO PEREIRA NUNES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DA p16 NO ENDOMÉTRIO.

Pesquisador: ARNOLDO ROCHA FACANHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 87472918.9.0000.5244

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO -
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.698.579

Apresentação do Projeto:

Projeto apresenta delineamento adequado e capaz de responder os objetivos da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo claro e preciso que se insere adequadamente no desenvolvimento do projeto de pesquisa: analisar comparativamente a expressão de p16 no endométrio normal, na patologia endometrial benigna, nas lesões consideradas precursoras do câncer de origem epitelial e no adenocarcinoma de endométrio, a fim de avaliar o potencial dessa proteína como biomarcador de rastreio e prognóstico da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não apresenta nenhum risco e o benefício esperado é buscar uma melhor compreensão da biologia molecular do câncer de endométrio através da identificação do valor da expressão da p16 comparando endométrio normal, patologia endometrial benigna, lesões consideradas precursora do câncer e adenocarcinoma de endométrio. Acredita-se que a proteína p16 tenha potencial como biomarcador molecular podendo auxiliar o rastreio do câncer de endométrio em pacientes assintomáticas e/ou auxiliar na identificação de pacientes que possam evoluir para uma recidiva da doença e consequente evolução desfavorável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum comentário ou considerações a fazer.

Endereço: Avenida Dr. Alberto Torres, 217
Bairro: Centro CEP: 28.025-880
UF: RJ Município: CAMPOS DOS GOYTACAZES
Telefone: (22)2101-2984 Fax: (22)2101-2929 E-mail: cepfmc@fmc.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
CAMPOS/FUNDAÇÃO
BENEDITO PEREIRA NUNES



Continuação do Parecer: 2.696.579

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme recomendado no parecer 2.627.479, da primeira versão do projeto apresentado, o documento de autorização para transporte e utilização dos blocos de parafina em outra instituição (necessário devido ao risco de desvio ou perda do material) foi apresentado. Sendo assim, o projeto de pesquisa apresentou todos os requisitos exigidos e de acordo com a Resolução nº 466/12 e novas normatizações da Plataforma Brasil.

Recomendações:

Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como resultado desta nova análise e com base na Resolução CNS nº 466/12, o projeto de pesquisa foi aprovado por seus próprios fundamentos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1083679.pdf	03/05/2018 22:17:43		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaopatologiaeaa.pdf	03/05/2018 20:10:53	ARNOLDO ROCHA FACANHA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/04/2018 20:04:29	ARNOLDO ROCHA FACANHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/03/2018 13:29:40	ARNOLDO ROCHA FACANHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	27/03/2018 07:55:56	ARNOLDO ROCHA FACANHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Neecessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Dr. Alberto Torres, 217
Bairro: Centro CEP: 28.035-680
UF: RJ Município: CAMPOS DOS GOYTACAZES
Telefone: (22)2101-2964 Fax: (22)2101-2929 E-mail: cepfmc@fmc.br