

Construção de “*Cell Microarrays*” como estratégia para avaliar alterações na expressão de proteínas induzidas por tratamentos em linhas celulares de cancro do ovário

Érica Carolina Amaral Oliveira

Relatório Final de Estágio Profissional apresentado à Escola Superior de Saúde, do Instituto Politécnico de Bragança, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo de Biotecnologia

Orientação Científica:

Professora Doutora Sara Alexandra Vinhas Ricardo;

Professora Doutora Josiana Vaz

Supervisão:

Doutora Mariana Oliveira Nunes

Este relatório final de estágio profissional não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri.

Bragança, 20 de Maio de 2025

Agradecimentos

Gostaria de começar por expressar a minha profunda gratidão às minhas orientadoras, Doutora Sara Ricardo e Doutora Josiana Vaz, pela oportunidade que me concederam ao aceitarem que realizasse a minha dissertação no Curso de Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde, no ramo de Biotecnologia. A vossa orientação foi essencial nesta jornada, e estou imensamente grata pelo encaminhamento, apoio, confiança, disponibilidade e generosidade. Acima de tudo, agradeço o conhecimento valioso que me transmitiram ao longo deste percurso. Obrigada por tudo!

Um agradecimento especial à minha orientadora, Doutora Sara Ricardo, pelo carinho inestimável, pelas palavras de incentivo, pela compreensão e, sobretudo, por ser mais do que uma orientadora: uma amiga. O seu apoio constante e a sua capacidade de ter sempre a palavra certa no momento certo foram fundamentais para mim.

Quero também agradecer à Doutora Mariana Nunes, pelos ensinamentos partilhados, pelo conhecimento transmitido, pela leitura atenta do meu trabalho e pelas sugestões e críticas construtivas que tanto contribuíram para o meu aprimoramento. Agradeço ainda a paciência e, acima de tudo, a amizade bonita que nasceu deste percurso.

À Cláudia, que esteve ao meu lado desde o primeiro até ao último dia, o meu sincero obrigado pela companhia, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, pelas conversas e por todos os momentos partilhados. O teu apoio fez toda a diferença nesta caminhada.

Um agradecimento muito especial aos meus pais e à minha irmã, pelo amor, paciência e carinho infinitos. Obrigada, por todas as vezes que me ouviram, por nunca deixarem de acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava, e por estarem sempre lá para me amparar nos momentos difíceis. Sem vocês, nada disto seria possível, e certamente não teria sido uma jornada tão feliz. Obrigada por me fazerem ver que, afinal, tudo é possível.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que acreditaram em mim, que me apoiaram e incentivaram a continuar a minha jornada.

Índice

Abreviaturas.....	5
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Resumo	10
Abstract.....	12
1. Introdução.....	14
1.1. Cancro do Ovário	15
1.1.1. Epidemiologia.....	15
1.1.2. Fatores de Risco	18
1.1.3. Classificação dos Carcinomas do Ovário	20
1.1.3.1. Classificação Histopatológica	20
1.1.3.2. Classificação Molecular	23
1.1.4. Tratamentos no Cancro do Ovário	24
1.1.4.1. Cirurgia.....	24
1.1.4.2. Quimioterapia	26
1.1.5. Quimioresistência	29
1.1.5.1. Marcadores Associados com a Resistência à Terapia	29
1.2. Técnicas Histológicas Aplicadas em Oncologia: O Papel dos <i>Tissue Microarrays</i> e <i>Cell Microarrays</i>	30
1.2.1. Avaliação de Proteínas Associadas com Diferenciação (MSLN), Viabilidade (Ki67), Apoptose (caspase 3 clivada e PARP clivada)	32
2. Objetivos	35
3. Material e Métodos.....	36
3.1. Linhas Celulares e Condições de Cultura.....	36
3.2. Ensaio com Tratamentos Oncológicos nas Linhas Celulares	37
3.3. Processamento Histológico.....	39
3.4. Construção do <i>Cell Microarray</i>	40

3.5.	Avaliação da Expressão das Proteínas	43
4.	Resultados	47
4.1.	A Expressão da Mesotelina Diminui na Linha Celular OVCAR8 PTX R C Quando Tratada em Combinação com a Ivermectina.....	47
4.2.	A Ivermectina Diminui a Expressão da P-gp na Linha Celular OVCAR8 PTX R C.....	50
4.3.	A Proliferação Diminuiu e a Apoptose Aumentou em Ambas as Linhas Celulares Quando Tratadas com Ivermectina.....	53
4.4.	A Expressão do ALDH1 Diminuiu em Ambas as Linhas Celulares Quando Tratadas com Ivermectina.....	61
5.	Discussão.....	65
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras	70
7.	Referências Bibliográficas	72

Abreviaturas

AI - Administração intraperitoneal

ALDH1 - Aldeído desidrogenase 1

BRAF - Homólogo B1 do oncogene viral do sarcoma murino V-raf

BRCA 1/2 - Gene do cancro da mama 1/2

CET - Células estaminais tumorais

CEO - Cancro epitelial do ovário

CMA - *Cell Microarray*

CO - Cancro do ovário

CSAG - Carcinoma seroso de alto grau

CSBG - Carcinoma seroso de baixo grau

DAB - Diaminobenzidina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FIGO- Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GOG- Grupo de Oncologia Ginecológica

HRP - Peroxidase de rábano

H&E - Hematoxilina e Eosina

IC₅₀ - Concentração da substância necessária para inibir 50% da atividade biológica alvo

ICC - Imunocitoquímica

KRAS - Homólogo do oncogene viral do rato Kirsten

MDR1 - Proteína de resistência a múltiplos fármacos 1

MSLN - Mesotelina

MUC16 - Mucina 16

NA - Não avaliável

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARP - Poli (ADP-ribose) polimerase

PenStrep - Penicilina/Streptomicina

P-gp - P-glicoproteína

RPMI - Instituto Memorial Roswell Park

SG - Sobrevida global

SLP - Sobrevida livre de progressão

SOP - Síndrome do ovário poliquístico

TMA - *Tissue Microarray*

TP53 – Proteína tumoral 53

Índice de Figuras

Figura 1 Taxas estimadas de incidência e mortalidade padronizadas por idade na Europa para mulheres de todas as idades.....	16
Figura 2 Taxa estimada de incidência (A) e mortalidade (B) padronizada para o cancro do ovário por idade na Europa para mulheres de todas as idades para 2045	17
Figura 3 Fatores de risco do cancro do ovário.....	18
Figura 4 Classificação histopatológica dos tumores do ovário.....	21
Figura 5 Tratamentos mais utilizados no cancro do ovário	27
Figura 6 Construção do <i>Cell Microarray</i>	31
Figura 7 Tratamento com as drogas.....	38
Figura 8 Processamento histológico do histogel TM	40
Figura 9 Construção do <i>Cell Microarray</i>	42
Figura 10 Avaliação da expressão das proteínas através da técnica da imunocitoquímica	45
Figura 11 Expressão da mesotelina diminui na linha celular OVCAR8 PTX R C tratadas em combinação com a ivermectina	48
Figura 12 Expressão de P-gp após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C ...	51
Figura 13 Expressão de Ki67 após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C ...	54
Figura 14 Expressão da caspase 3 clivada após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C	57
Figura 15 Expressão de PARP clivada após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel, e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C	60

Figura 16 | Expressão da ALDH1 após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel, e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C63

Índice de Tabelas

Tabela I | Resumo das características clínico patológicas dos tumores tipo I e tipo II ..24

Resumo

O Cancro do Ovário é uma das principais causas de morte por cancro ginecológico, caracterizando-se frequentemente por um diagnóstico tardio devido à ausência de sintomas específicos em fases iniciais. A elevada taxa de mortalidade associada deve-se, em grande parte, à resistência aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia baseada em agentes como a carboplatina e o paclitaxel. A investigação sobre novos compostos e estratégias terapêuticas, como a utilização da ivermectina, tem vindo a ganhar destaque na tentativa de contornar este desafio.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de um estágio de natureza profissional realizado no Laboratório de Patologia Toxicológica da CESPU, integrado na unidade de investigação UCIBIO, com a duração de 375 horas. Durante o estágio, tive a oportunidade de adquirir competências laboratoriais relevantes, tais como interpretação e apresentação de resultados científicos, escrita de protocolos e relatórios técnicos, cumprimento de boas praticas laboratoriais e trabalhar em equipa multidisciplinar. Assim como, adquirir diferentes técnicas laboratoriais tais como, cultura celular em 2D e 3D, incluindo organoides, avaliação de viabilidade celular, em histologia: processamento histológico, imunocitoquímica, H&E, colorações especiais tais como Tricrómio de Masson e *Sirius Red* e construção de *cell microarray*. Este contexto de formação prática e investigação científica culminou na concretização do presente estudo, cujo objetivo foi avaliar a eficácia da ivermectina, isolada e em combinação com carboplatina e paclitaxel, na inibição da viabilidade celular em modelos de cancro do ovário, bem como investigar alterações na expressão de biomarcadores associados à quimiorresistência.

Foram utilizadas duas linhas celulares tumorais: uma resistente à carboplatina (OVCAR8) e outra resistente à carboplatina e paclitaxel (OVCAR8 PTX R C). As células foram expostas a diferentes regimes terapêuticos e analisadas por imunocitoquímica, integrando-se as amostras em *cell microarrays* para avaliação da expressão de marcadores moleculares relevantes.

Os resultados demonstraram uma redução significativa na viabilidade celular quando a ivermectina foi utilizada em combinação com os quimioterápicos, sugerindo um potencial efeito sinérgico destas combinações. Além disso, a expressão de determinados biomarcadores, nomeadamente a P-gp e a Mesotelina, indicou uma possível reversão do fenótipo resistente, abrindo novas perspetivas para futuras abordagens terapêuticas.

Em conclusão, este estudo, desenvolvido no contexto de um estágio laboratorial, contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre o cancro do ovário e reforça a importância

da investigação translacional na identificação de novas estratégias terapêuticas para contornar a quimiorresistência.

Abstract

Ovarian cancer is one of the main causes of death from gynaecological cancer and is often characterized by late diagnosis due to the absence of specific symptoms in the early stages. The associated high mortality rate is largely due to resistance to conventional treatments, such as chemotherapy based on agents like carboplatin and paclitaxel. Research into new compounds and therapeutic strategies, such as the use of ivermectin, has been gaining prominence in an attempt to overcome this challenge.

This work was carried out as part of a professional internship at CESPUS Toxicological Pathology Laboratory, as part of the UCIBIO research unit, which lasted 375 hours. During the internship, I had the opportunity to acquire relevant laboratory skills, such as interpreting and presenting scientific results, writing protocols and technical reports, complying with good laboratory practices and working in a multidisciplinary team. As well as acquiring different laboratory techniques such as 2D and 3D cell culture, including organoids, cell viability assessment, histology (histological processing, immunocytochemistry, H&E, special stains such as Masson's Trichrome and Sirius Red and cell microarray construction). This context of practical training and scientific research culminated in this study, the aim of which was to assess the efficacy of ivermectin, alone and in combination with carboplatin and paclitaxel, in inhibiting cell viability in models of ovarian cancer, as well as to investigate changes in the expression of biomarkers associated with chemoresistance.

Two tumor cell lines were used: one resistant to carboplatin (OVCAR8) and the other resistant to carboplatin and paclitaxel (OVCAR8 PTX R C). The cells were exposed to different therapeutic regimens and analyzed by immunocytochemistry, integrating the samples into cell microarrays to assess the expression of relevant molecular markers.

The results showed a significant reduction in cell viability when ivermectin was used in combination with chemotherapy, suggesting a potential synergistic effect of these combinations. In addition, the expression of certain biomarkers, namely P-gp and Mesothelin, indicated a possible reversal of the resistant phenotype, opening up new perspectives for future therapeutic approaches.

In conclusion, this study, carried out in the context of a laboratory internship, contributes to furthering our knowledge of ovarian cancer and reinforces the importance of

translational research in identifying new therapeutic strategies to overcome chemoresistance.

1. Introdução

O presente estágio de natureza profissional decorreu no Laboratório de Patologia Toxicológica do Instituto Universitário de Ciências da Saúde (CESPU), integrado na Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas (UCIBIO), um laboratório associado de investigação científica. Este teve início a 2 de outubro de 2024 e prolongou-se até 30 de abril de 2025.

Durante este período, estive envolvida em atividades de investigação com foco no estudo do cancro do ovário, tendo contribuído para o desenvolvimento experimental de vários projetos de investigação. Esta experiência permitiu-me não só aprofundar o conhecimento em modelos biológicos relevantes, como também consolidar uma vasta gama de competências técnicas. Trabalhei com sistemas de cultura celular em duas e três dimensões, nomeadamente linhas celulares convencionais e organoides derivados de tecido tumoral, representando modelos fisiologicamente mais relevantes. Realizei ensaios de viabilidade e citotoxicidade para avaliar a resposta celular a diferentes compostos.

Adicionalmente, tive contato regular com técnicas de histologia clássica e avançada, incluindo o processamento e inclusão de amostras em parafina, microtomia, coloração de tecidos (como hematoxilina & eosina), imunocitoquímica, imunohistoquímica e colorações especiais – destacando-se o Tricrómio de Masson e o *Sirius Red*, utilizadas para avaliação de matriz extracelular e fibrose. Também participei na construção de *cell microarrays*, otimizando a análise paralela de múltiplas amostras numa única lâmina.

Paralelamente à consolidação de conhecimentos técnicos, este estágio de natureza profissional contribuiu significativamente para o meu crescimento a nível pessoal e profissional. A integração numa equipa multidisciplinar, proporcionou-me um ambiente de aprendizagem estimulante, onde tive a oportunidade de desenvolver e reforçar competências essenciais, como o trabalho em equipa, a comunicação científica clara e eficaz, a gestão rigorosa de tempo em contexto laboratorial, o pensamento crítico, a autonomia e a capacidade de resolução de problemas de forma proativa e fundamental.

Ao longo deste percurso, aprofundei o meu conhecimento sobre a biologia do cancro, com particular enfoque nos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão tumoral. Tornei-me mais consciente dos inúmeros desafios associados ao diagnóstico precoce e à resistência aos tratamentos atualmente disponíveis, o que reforçou a noção da urgência e relevância da investigação translacional. Esta experiência permitiu-me compreender, com maior profundidade, como a ponte entre a

investigação básica e a prática clínica pode abrir um caminho para a identificação e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficazes e personalizadas, capazes de responder às necessidades das pacientes com cancro do ovário. Paralelamente, comecei a reconhecer, de forma mais clara, o verdadeiro significado da profissão de investigador. Percebi que ser investigador é muito mais do que dominar técnicas ou interpretar resultados, é abraçar uma missão que exige dedicação, resiliência e sentido de propósito. Senti em mim a responsabilidade de contribuir para um corpo de conhecimento que pode, um dia, mudar vidas. Esta tomada de consciência aproximou-me ainda mais do compromisso ético e humano que sustenta a investigação científica, despertando em mim um profundo respeito por esta profissão que, através do rigor, da curiosidade e da persistência, procura incessantemente respostas para problemas complexos com impacto real na vida das pessoas.

Durante o estágio, tive a oportunidade de desenvolver um trabalho de investigação focado na análise da resposta de linhas tumorais de cancro do ovário a diferentes estratégias terapêuticas, com especial ênfase na utilização de agentes quimioterápicos convencionais em combinação com fármacos reaproveitados. Este trabalho enquadrou-se num projeto mais alargado de investigação translacional, permitindo uma abordagem integrada desde as linhas celulares até à análise de biomarcadores.

O presente relatório inicia-se com uma contextualização teórica do cancro do ovário, seguindo-se a descrição dos objetivos, metodologias utilizadas, apresentação dos resultados obtidos e respetiva discussão. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de diversos biomarcadores após tratamento com agentes quimioterápicos, isoladamente ou em combinação com fármacos reaproveitados, como a ivermectina, utilizando a abordagem de *cell microarray*.

1.1. Cancro do Ovário

1.1.1. Epidemiologia

O cancro do ovário (CO) é uma das neoplasias malignas com maior taxa de mortalidade entre as mulheres, sendo o sétimo tumor mais frequente e a sexta causa de morte por cancro a nível global, com aproximadamente 324.603 novos casos e 206.956 óbitos em todo o Mundo (Figura 1) (*Cancer Today*, 2025). Este tipo de cancro é frequentemente diagnosticado em estadios avançados, o que complica o tratamento e reduz significativamente as taxas de sobrevivência (S. Kim et al., 2016). A incidência do

CO tem apresentado um aumento anual, com uma tendência preocupante de acometer mulheres em idades mais jovens (Zhang et al., 2025).

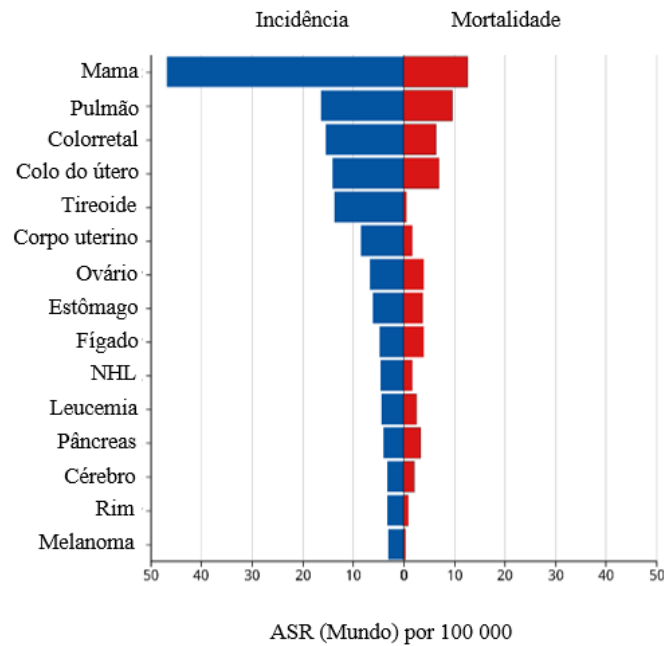


Figura 1. Taxas estimadas de incidência e mortalidade padronizadas por idade na Europa para mulheres de todas as idades. O gráfico "Cancer Today" ilustra as taxas de incidência e mortalidade do CO na atualidade. ASR - taxa padronizada por idade (dados Globocan 2022, ordenados por mortalidade); CO – cancro do ovário.

Olhando para o futuro, as projeções indicam um aumento global na incidência e mortalidade do cancro do ovário até 2045 (Figura 2) (*Cancer Tomorrow*, 2025). A Europa destaca-se como um dos continentes mais afetados, com crescimentos estimados de 9,2% (*Cancer Tomorrow*, 2025). Na Europa, espera-se que o número de casos atinja 75.877 (*Cancer Tomorrow*, 2025).

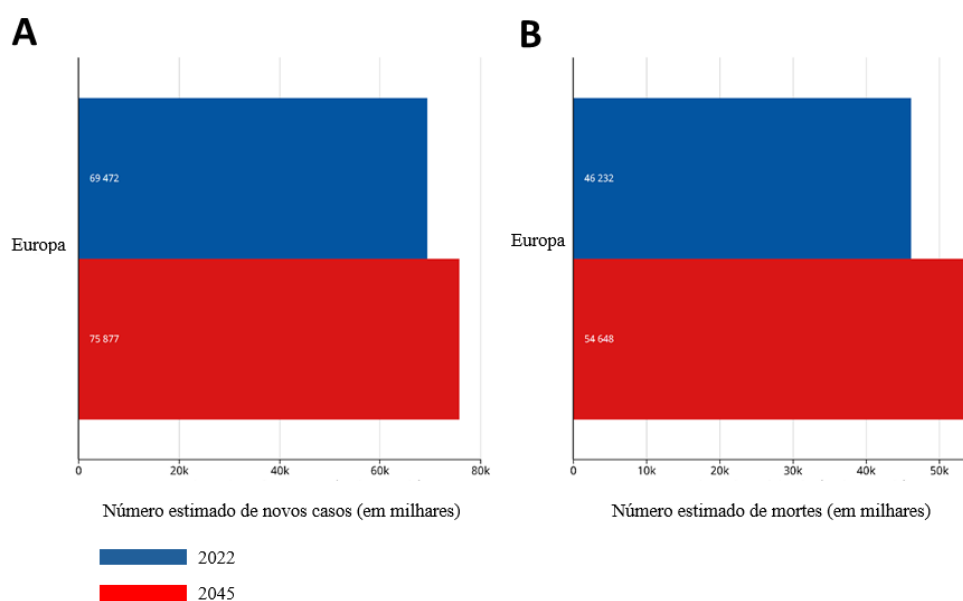


Figura 2. Taxa estimada de incidência (A) e mortalidade (B) padronizada para o cancro do ovário por idade na Europa para mulheres de todas as idades para 2045. (dados Globocan 2022, ordem por mortalidade).

Os sintomas mais frequentes do CO incluem inchaço, pressão ou dor na região pélvica e abdominal (Ferrell et al., 2003; Matulonis et al., 2016). Podem surgir problemas gastrointestinais, como a perda de apetite, sensação de saciedade precoce, indigestão, náuseas, vômitos, refluxo ácido, e alterações no trânsito intestinal, como obstipação ou diarreia (Lataifeh et al., 2005; Wynn et al., 2007). Para além disso, algumas pacientes também relatam aumento da frequência urinária, dores ou desconforto nas costas, fadiga, perda de peso e irregularidades no ciclo menstrual, sendo que em estádios mais avançados podem apresentar também alguns sintomas respiratórios (Goff et al., n.d.; Lheureux et al., 2019; Matulonis et al., 2016).

Outro desafio associado ao CO é o impacto negativo na qualidade de vida das pacientes. Alguns estudos demonstram que os distúrbios e a qualidade do sono são frequentes, estando diretamente relacionados com a depressão e a uma pior qualidade de vida (Clevenger et al., 2013; Sandadi et al., 2011). Além disso, fatores como o stresse e isolamento social também influenciam negativamente o bem-estar geral e estão associados com uma menor sobrevivência (Lutgendorf et al., 2012, 2013).

1.1.2. Fatores de Risco

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CO são complexos e multifatoriais, incluindo componentes genéticas, reprodutivas, hormonais, ginecológicas, demográficas e estilo de vida (Figura 3) (Ferlay et al., 2010; Momenimovahed et al., 2019; Norquist et al., 2016; Purdie et al., 2003; Ushijima, 2009).

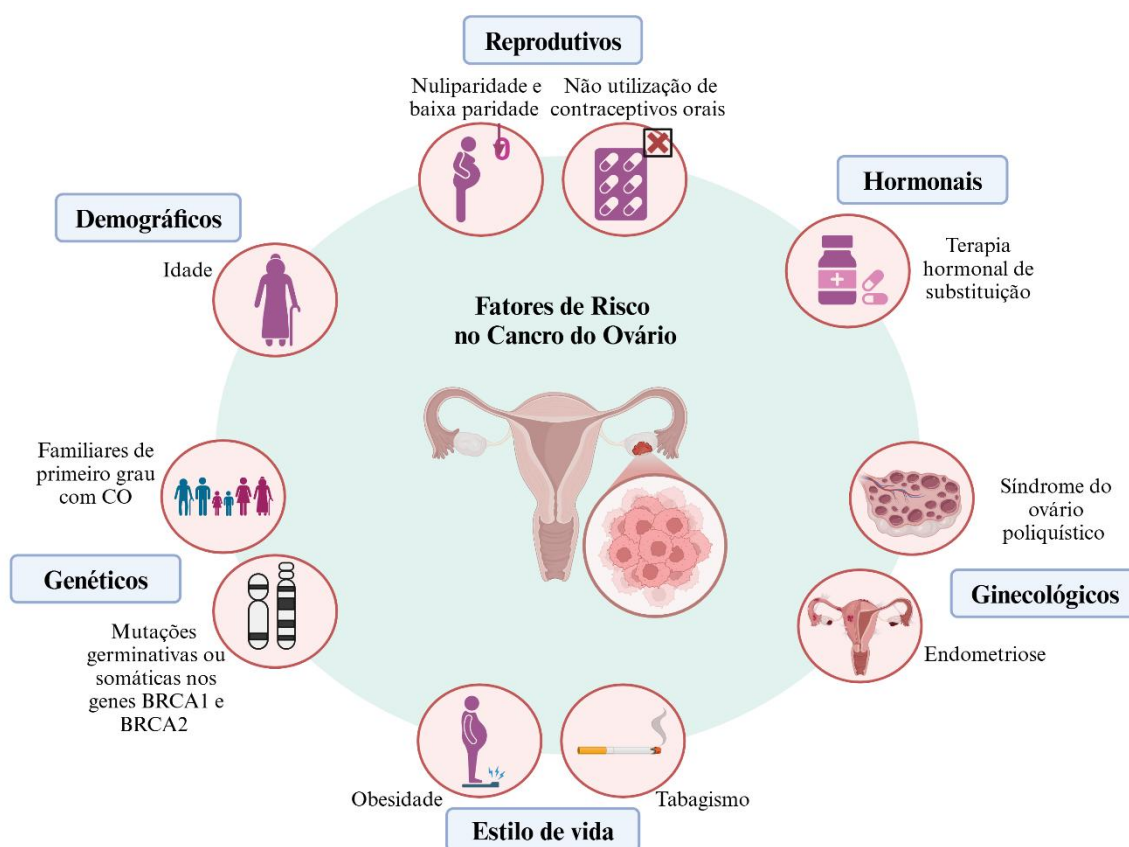


Figura 3. Fatores de risco do cancro do ovário. São compreendidos por seis fatores: demográficos, genéticos, estilo de vida, ginecológicos, hormonais e reprodutivos. Dentro de cada fator, estão descritos alguns exemplos de riscos para o desenvolvimento do CO. CO - cancro do ovário. Figura criada com Biorender.com. (Chiaffarino et al., 2001; Cibula et al., 2010; Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2008; Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2015; Donnez et al., 1985; Ferlay et al., 2010; Gaitskell et al., 2018; Gayther & Pharoah, 2010; Hankinson e Danforth, 2006; Hennessy et al., 2009; Holdsworth-Carson et al., 2023; Iyer & Lee, 2010; Jordan et al., 2006; Kauff et al., 2008; King et al., 2003; Kuchenbaecker et al., 2017; La Vecchia, 2017; Mavaddat et al., 2012; Momenimovahed et al., 2019; Norquist et al., 2016; Purdie et al., 2003; Rooth, 2013; Salehi et al., 2008; Schouten et al., 2008; Tossetta & Inversetti, 2023; Tworoger et al., 2007; Ushijima, 2009; Vecchia et al., n.d.; Watson et al., 2008; Whittemore et al., 2004)

Entre os fatores demográficos, destaca-se a idade, com um aumento significativo do risco em mulheres pós-menopausa (Hankinson e Danforth, 2006). A menarca precoce e a menopausa tardia também aumentam o risco para desenvolver CO (La Vecchia, 2017).

Os fatores reprodutivos incluem o número elevado de ciclos ovulatórios, que estão associados a flutuações cíclicas de estrogénios, progesterona e androgénios, podendo induzir alterações celulares nas trompas de Falópio (Donnez et al., 1985; Holdsworth-Carson et al., 2023). A gravidez, que interrompe temporariamente os ciclos menstruais e é marcada por níveis elevados de progesterona, está associada a um risco reduzido de CO (Gaitskell et al., 2018). A nuliparidade e a baixa paridade estão também associadas com um risco aumentado, enquanto cada gravidez adicional reduz o risco em cerca de 50% (Chiaffarino et al., 2001; Iyer & Lee, 2010; Tworoger et al., 2007; Vecchia et al., n.d.). Por outro lado, a amamentação e o uso de contraceptivos orais apresentam um efeito protetor significativo (Hennessy et al., 2009; Salehi et al., 2008). A utilização prolongada de contraceptivos orais reduz o risco em cerca de 25% a 30%, podendo atingir 50% após uma utilização de 10 anos ou mais, com um efeito protetor que persiste por pelo menos 30 anos após a sua suspensão (Cibula et al., 2010; Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2008; Vecchia et al., n.d.).

Os fatores ginecológicos incluem endometriose, doença inflamatória pélvica e síndrome do ovário poliquístico (SOP). Estas doenças, associadas com a inflamação crónica e alterações hormonais, aumentam a probabilidade de desenvolver CO (Tossetta & Inversetti, 2023).

Os fatores genéticos são particularmente relevantes, especialmente as mutações germinativas ou somáticas nos genes BRCA1 e BRCA2 (King et al., 2003; Kuchenbaecker et al., 2017). Aproximadamente 5% a 15% dos CO ocorrem em mulheres portadoras de mutações nos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2, o que aumenta significativamente para 40 a 50% o risco de desenvolver esta doença, (Gayther & Pharoah, 2010; Kauff et al., 2008; Watson et al., 2008). Estas mutações estão frequentemente associadas ao subtipo seroso do CO e associadas com um maior risco para desenvolver cancro da mama (King et al., 2003; Kuchenbaecker et al., 2017; Mavaddat et al., 2012). Além disso, uma história familiar, onde dois ou mais casos de CO ou cancro da mama em familiares de primeiro grau é igualmente um fator de risco importante, sendo também associado ao desenvolvimento de CO hereditário (Kauff et al., 2008; Whittemore et al., 2004).

Os fatores hormonais incluem o uso de terapia de substituição hormonal após a menopausa, com um risco relativo de 1,34 para usuárias (Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2015).

Fatores relacionados com os estilos de vida incluem a obesidade e o tabagismo, que podem contribuir para o aumento do risco (Jordan et al., 2006; Rooth, 2013; Schouten et al., 2008).

Apesar da complexidade dos fatores de risco, a ausência de ferramentas eficazes de rastreamento na prática clínica destaca a necessidade de identificação precoce dos sintomas e sensibilização para a importância do diagnóstico precoce (Macdonald et al., 2006; Robb et al., 2009; Rooth, 2013). A implementação de medidas preventivas é crucial para reduzir a incidência e melhorar as taxas de sobrevivência associadas ao cancro do ovário (Macdonald et al., 2006; Robb et al., 2009; Rooth, 2013).

1.1.3. Classificação dos Carcinomas do Ovário

1.1.3.1. Classificação Histopatológica

Os tumores do ovário podem ser classificados segundo os sistemas da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Grupo de Oncologia Ginecológica (GOG) (Cho & Shih, 2009). O sistema FIGO, por exemplo, utiliza três níveis baseados em critérios específicos, enquanto o sistema da OMS é considerado mais subjetivo, pois não atribui características com base em critérios quantitativos (Malpica et al., 2004; Seidman et al., 2006). De acordo com a classificação da OMS, os tumores do ovário são predominantemente epiteliais, representando cerca de 90% dos casos (Höhn AK et al., 2021). Outros tipos incluem os tumores de origem em células germinativas (3%) e aqueles derivados do estroma dos cordões sexuais (2%) (Höhn AK et al., 2021). Os tumores epiteliais, podem ser subdivididos em cinco subtipos principais com base na histopatologia, nas características imunológicas e no perfil molecular, sendo divididos em serosos (~70%), endometrióides (~10%), mucinosos (<4%), de células claras (<10%) e histotipos raros (<5%) (Höhn AK et al., 2021). O subtipo seroso, que compreende 70% dos casos do cancro epitelial do ovário (CEO) (Höhn AK et al., 2021; Peres et al., 2019), é subdividido em dois grupos principais de acordo com a sua agressividade e invasão: carcinoma seroso de alto grau (CSAG) e carcinoma seroso de baixo grau (CSBG) (Figura 4) (Kurman & Shih, 2008; Peres et al., 2019). O CSAG é o subtipo mais prevalente, correspondendo a cerca de 70% dos casos

(Höhn AK et al., 2021) e caracteriza-se pelo rápido crescimento, elevada capacidade de metastização e diagnóstico frequente em estadios avançados (III e IV) (Lengyel, 2010; Lisio et al., 2019). Tais características reforçam a necessidade de implementar estratégias eficazes de rastreio e intervenções precoces para melhorar os desfechos clínicos e a sobrevivência das pacientes (Lengyel, 2010; Lisio et al., 2019). Apesar das diferenças significativas entre os dois subtipos, são tratados como uma entidade única do ponto de vista clínico, com uma abordagem terapêutica baseada em cirurgia citorrredutora e quimioterapia combinada com carboplatina e paclitaxel (Höhn AK et al., 2021). Embora a taxa inicial de resposta ao tratamento de primeira linha seja elevada (80% a 90%), a maioria das pacientes acaba por desenvolver resistência à quimioterapia com doença recorrente resultando numa taxa de sobrevivência a cinco anos inferior a 25% (Höhn AK et al., 2021).

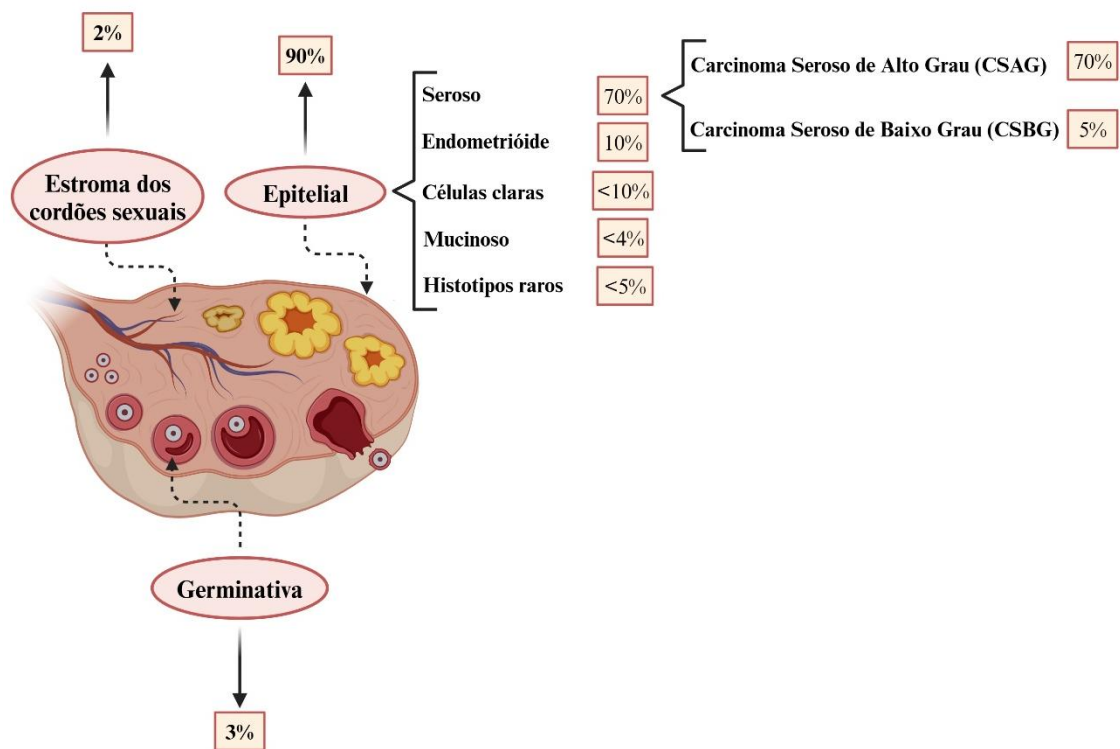


Figura 4. Classificação histopatológica dos tumores do ovário. O subtipo epitelial inclui cinco subtipos: tumores serosos, endometrióides, mucinosos, de células claras e histotipos raros. O subtipo seroso pode ainda ser subdividido com base na histologia do tumor e na classificação em carcinoma seroso de baixo grau (CSBG) e carcinoma seroso de alto grau (CSAG). Figura criada com Biorender.com. (Höhn AK et al., 2021; Kurman & Shih, 2008; Peres et al., 2019)

Para além disso, os tumores epiteliais podem ser classificados como benignos, *borderline* ou malignos, refletindo o grau de proliferação celular, atipia nuclear e invasão do estroma (Prat, 2012). Os tumores benignos, como os cistadenomas, são predominantemente císticos, sem invasão estromal. Os tumores *borderline* exibem proliferação celular e atipia nuclear variáveis, sem invasão, e podem evoluir para CSBG (Berek et al., 2017; Prat, 2012). Os tumores malignos, como os adenocarcinomas serosos, frequentemente apresentam invasão estromal, padrões sólidos e áreas de necrose (Berek et al., 2017; Prat, 2012).

Os carcinomas serosos apresentam padrões de crescimento cístico, papilar ou sólido, frequentemente com infiltração no estroma fibrótico e corpos de psamoma (áreas de calcificação) (Telloni, 2017). Os CSAG são agressivos, associados a alterações genéticas complexas, enquanto os de CSBG possuem cariótipos mais simples e evolução mais lenta, muitas vezes progredindo a partir de tumores *borderline* (Micci et al., 2014). Os carcinomas endometrióides são glandulares ou papilares, semelhantes a adenocarcinomas endometriais, com alterações genómicas específicas, como por exemplo os ganhos em regiões cromossómicas (Micci et al., 2014; Telloni, 2017). Os carcinomas de células claras apresentam padrões genómicos distintos, com células cúboides ou poligonais, glicogénio citoplasmático abundante e núcleos vesiculares (Micci et al., 2014; Telloni, 2017). Já os carcinomas mucinosos são caracterizados por tumores císticos multiloculares, revestidos por células colunares com núcleos estratificados (Micci et al., 2014; Telloni, 2017).

Os carcinomas não epiteliais, representam 10% a 15% dos casos de CO, incluem tumores de células germinativas e tumores estromais do cordão sexual (Boussios et al., 2016; Colombo et al., 2012). Os tumores de células germinativas, como teratomas, originam-se nas células germinativas primordiais da gônada embrionária (Koulouris & Penson, 2009; Stewart et al., 2019) e são mais comuns em mulheres jovens (<30 anos) (Colombo et al., 2012). Os tumores estromais do cordão sexual, frequentemente derivados das células da granulosa, têm um comportamento biológico distinto (Boussios et al., 2016; Colombo et al., 2012).

A relação entre tipos histológicos e endometriose é evidente em carcinomas de células claras e endometrióides, frequentemente associados à condição, enquanto carcinomas serosos estão relacionados a disseminação peritoneal avançada (Kaku et al., 2003). Em termos de estadio, os carcinomas serosos são geralmente bilaterais e diagnosticados nos estádios III ou IV, enquanto os carcinomas de células claras,

endometrióides e mucinosos são frequentemente diagnosticados em estadios iniciais (I ou II) (Kaku et al., 2003).

1.1.3.2. Classificação Molecular

Os CO podem ser subdivididos em dois grupos principais: tipo I e tipo II, com diferenças marcantes em termos de morfologia, genética e comportamento clínico (Di Cristofano & Ellenson, 2007).

Os carcinomas de tipo I englobam CSBG, endometrióides, mucinosos e de células claras (Cho & Shih, 2009). Eles apresentam um crescimento lento e, na maioria das vezes, estão restritos ao ovário ao diagnóstico (Cho & Shih, 2009). Esses tumores evoluem a partir de lesões precursoras bem definidas, como os tumores serosos limítrofes. A nível molecular, mutações em genes das vias de sinalização, como o KRAS e BRAF, são comuns, especialmente nos CSBG, estando presentes em mais de 50% dos casos (Cho & Shih, 2009; Singer et al., 2003). Essas alterações genéticas resultam em proliferação celular descontrolada e promovem a progressão tumoral.

Em contrapartida, os carcinomas do tipo II, que incluem os CSAG, são mais agressivos e frequentemente diagnosticados em estadios avançados (Crum et al., n.d.; Kindelberger et al., 2007; Lee et al., 2007). São caracterizados por instabilidade cromossômica e uma elevada frequência de mutações no gene TP53 (Leitao et al., 2004; Salani et al., 2008; Singer et al., n.d.; Willner et al., 2007), um evento-chave que desregula algumas vias de sinalização celular, o que dificulta o desenvolvimento de terapias direcionadas eficazes (Cho & Shih, 2009). Os carcinomas do tipo II tendem a disseminar rapidamente pelos órgãos pélvicos e peritoneais, resultando num prognóstico desfavorável (Tabela 1) (Cho & Shih, 2009).

A caracterização molecular dos CO avançou significativamente com estudos de perfil de expressão genética. Em 2008, Tothill et al. analisaram 285 amostras de tumores invasivos, identificando seis subtipos moleculares distintos (C1 - C6), com relevância prognóstica (Konecny et al., 2014; Testa et al., 2018; Tothill et al., 2008). Os carcinomas serosos e endometrióides de alto grau foram incluídos nos subtipos C1 (alta resposta estromal), C2 (assinatura imunitária elevada), C4 (baixa resposta estromal) e C5 (mesenquimal, com baixa resposta imunitária). Já os tumores de baixo grau ou de baixo potencial maligno foram classificados nos subtipos C3 (semelhantes a tumores limítrofes) e C6 (endometrióides de baixo grau) (Tothill et al., 2008).

Num estudo complementar realizado em 2013, Verhaak et al. propuseram quatro assinaturas moleculares para os CSAG, baseando-se em padrões de expressão genética (Kurman & Shih, 2016; Verhaak et al., 2013). Essas assinaturas foram denominadas imunorreativa, diferenciada, proliferativa e mesenquimal. Cada uma delas reflete diferentes características biológicas, o que podem impactar a resposta ao tratamento e o desfecho clínico.

Tabela 1. Resumo das características clínico patológicas dos tumores do tipo I e tipo II. (Cho & Shih, 2009; Crum et al., n.d.; Kindelberger et al., 2007; Lee et al., 2007; Leitao et al., 2004; Salani et al., 2008; Singer et al., 2003; Singer et al., n.d.; Willner et al., 2007)

	Tipo I	Tipo II
Tipo de tumores	Serosos de baixo grau, endometrióides, mucinosos e de células claras	Serosos de alto grau
Estadio	Cedo	Avançado
Crescimento	Lento	Rápido e agressivo
Nível molecular	Mutações em genes das vias de sinalização (KRAS e BRAF)	Instabilidade cromossômica e uma elevada frequência de mutações no gene TP53

Embora essas classificações moleculares tenham contribuído para uma melhor compreensão da biologia dos CO, a sua aplicação clínica ainda enfrenta desafios. A heterogeneidade desses tumores complica o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas, exigindo mais estudos para validação clínica das assinaturas moleculares propostas.

1.1.4. Tratamentos no Cancro do Ovário

Desde a década de 1970, a abordagem combinada de cirurgia citorrredutora e quimioterapia à base de platina e taxano consolidou-se como tratamento padrão para o CO (Griffiths & Fuller, 1978).

1.1.4.1. Cirurgia

A cirurgia citorrredutora é um dos pilares fundamentais no tratamento do CO, especialmente em estadios avançados (Hacker & Rao, 2017). O objetivo principal desta

cirurgia é remover o máximo possível de tecido tumoral visível, com vista em alcançar uma citorredução completa, ou seja, a ausência de doença macroscópica residual (Du Bois et al., 2012). Dependendo do estadió da doença ao diagnóstico, a resseção cirúrgica pode incluir histerectomia abdominal, salpingo-ooforectomia unilateral ou bilateral, omentectomia parcial ou completa, linfadenectomia e lavagem peritoneal (Berek et al., 2017; Lengyel, 2010; Matulonis et al., 2016). Além disso, a realização da cirurgia em centros de alta complexidade tem demonstrado ser um fator determinante reduzindo a morbidade e melhorando a sobrevida das pacientes (Wright et al., 2012). O sucesso da cirurgia citoredutora é um dos fatores prognósticos mais importantes, especialmente para pacientes com doença avançada, apresentando diferenças significativas nas taxas de resposta à quimioterapia, na sobrevida livre de progressão e na sobrevida global. Estudos destacam que pacientes submetidos à citorredução ótima apresentam melhores resultados em comparação com aquelas com doença residual significativa (Bois et al., 2009; Winter et al., 2007). A citorredução ideal refere-se à ausência de doença residual macroscópica, com lesões tumorais reduzidas a menos de 1 cm (Lisio et al., 2019; Matulonis et al., 2016; Stuart et al., 2011). Pacientes com doença residual baixa (<1 cm) apresentam um prognóstico mais favorável em relação às pacientes com doença residual elevada (>1 cm) (Foley et al., 2013). Vários estudos demonstram que a ausência de doença residual está fortemente associada com melhores taxas de sobrevivência (Winter et al., 2008). Por exemplo, uma análise de dados europeus envolvendo mais de 3000 pacientes demonstrou uma mediana de sobrevida de 99,1 meses para pacientes sem doença residual, em comparação com 36,2 meses para aquelas com doença remanescente de 1 a 10 mm e 29,6 meses para doença remanescente superior a 10 mm (Hacker & Rao, 2017).

Em pacientes com doença avançada, a abordagem cirúrgica pode ser precedida por quimioterapia neoadjuvante com carboplatina e paclitaxel, com o objetivo de reduzir o volume tumoral e facilitar a cirurgia subsequente. Essa estratégia tem ganho destaque, especialmente em casos onde o tumor é considerado inoperável ao diagnóstico. Estudos indicam que a quimioterapia neoadjuvante pode resultar numa redução significativa do volume tumoral, permitindo uma citorredução mais eficaz durante a cirurgia (Jacob et al., 1991; Kayikç et al., 2001; Schwartz et al., 1999; Steed et al., n.d.; Surwit et al., 1996; Vergote et al., 1998).

O debate sobre a sequência ideal entre cirurgia e quimioterapia continua na literatura médica. Tradicionalmente, a cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante era considerada a abordagem padrão (Kohandel et al., 2006). No entanto, estudos mais

recentes sugerem que a quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia pode ser mais eficaz em alguns casos, especialmente quando o tumor apresenta um grande volume inicial (Kohandel et al., 2006). A escolha entre essas abordagens deve considerar as características específicas de cada paciente, o estadio da doença e as condições clínicas gerais.

Além da cirurgia citorrredutora, outros tratamentos cirúrgicos podem ser utilizados para controle sintomático e melhora da qualidade de vida das pacientes. A ressecção de metástases peritoneais e linfadenectomias são exemplos de procedimentos adicionais que podem ser realizados, dependendo da extensão da doença (González-Martín et al., 2014; Lisio et al., 2019; Matulonis et al., 2016).

Dados do programa *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), sendo este uma fonte de informações epidemiológicas sobre a incidência e as taxas de sobrevivência do cancro nos Estados Unidos fornecido pelo *National Cancer Institute*, indicam que a sobrevida relativa em cinco anos para pacientes com CEO em estadio III é de aproximadamente 36%, enquanto para o estadio IV essa taxa diminuiu para cerca de 17% (Baldwin et al., 2012). Esses números ressaltam a importância da cirurgia como parte do tratamento multidisciplinar, que inclui também quimioterapia e, em alguns casos, terapias dirigidas e cuidados paliativos (Hacker & Rao, 2017).

1.1.4.2. Quimioterapia

A quimioterapia é uma intervenção terapêutica essencial no tratamento do CO particularmente em estadios avançados (estadios III e IV) (Hacker & Rao, 2017). A combinação de quimioterapia e cirurgia citorrredutora tem demonstrado melhorar significativamente as taxas de sobrevivência global.

Nos últimos anos, a quimioterapia neoadjuvante tem sido amplamente utilizada, especialmente em pacientes com estado geral comprometido ou apresentações clínicas graves, como grandes volumes de ascite ou efusões pleurais. Esta abordagem visa reduzir a carga tumoral e minimizar as complicações pós-operatórias, embora possa dificultar a cirurgia subsequente devido à resposta inflamatória induzida pelo tratamento (Dewdney et al., 2010; Hacker & Rao, 2017; Wright et al., 2012). Estudos, como o realizado pela EORTC-NCIC envolvendo 670 pacientes, demonstraram que a combinação de quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia citorrredutora resultou numa sobrevida média de 30 meses, comparável aos 29 meses observados em pacientes submetidas à cirurgia primária seguida de quimioterapia. A taxa de citorredução ideal foi

significativamente maior após a quimioterapia neoadjuvante (80,6%) em comparação com a cirurgia primária (41,6%), sublinhando a necessidade de personalizar o tratamento (Hacker & Rao, 2017).

A terapia de primeira linha para o CEO avançado continua a ser baseada na combinação de agentes de platina e taxano, particularmente a carboplatina e o paclitaxel, respetivamente (Berek et al., 2017; González-Martín et al., 2014). Para pacientes diagnosticadas em estadios iniciais, o uso de quimioterapia depende da histologia, grau e estadio do tumor (Matulonis et al., 2016). No entanto, em casos de doença avançada, recomenda-se geralmente a administração de pelo menos seis ciclos de quimioterapia combinada (Figura 5) (Lengyel, 2010). Alguns estudos confirmaram os benefícios desta abordagem tanto na sobrevida global (SG) quanto na sobrevida livre de progressão (SLP), destacando a eficácia da combinação de carboplatina e paclitaxel em relação a regimes baseados em agentes únicos (Illiam et al., 1996; Piccart et al., n.d.).

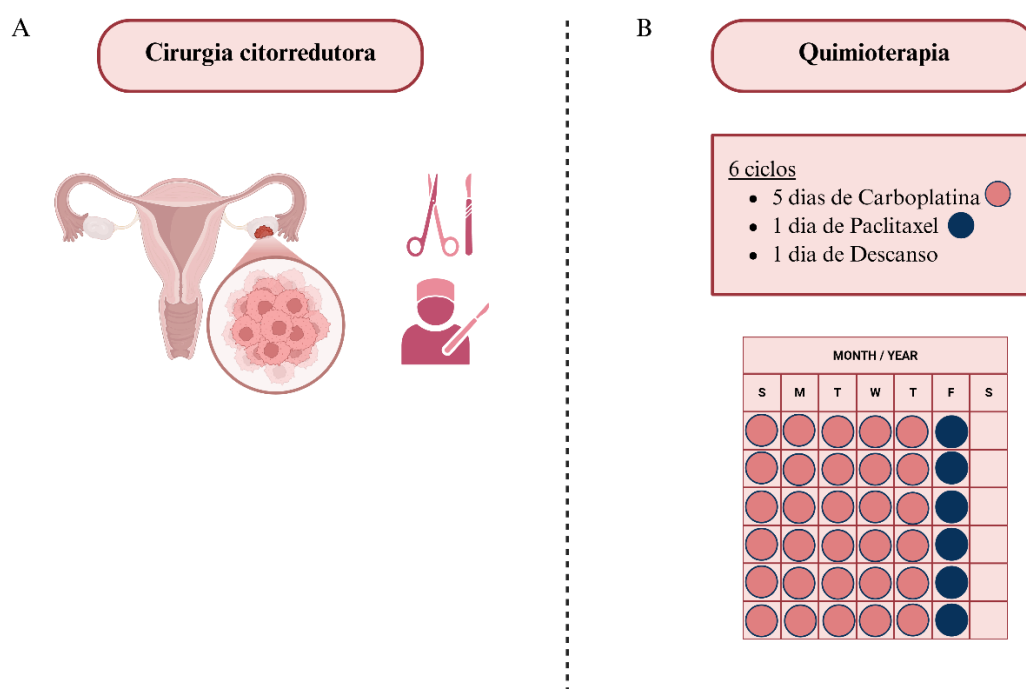


Figura 5. Tratamentos mais utilizados no cancro do ovário. Envolve várias abordagens, sendo a cirurgia citorrredutora e a quimioterapia os mais comuns. Esses tratamentos são geralmente combinados para melhorar as taxas de sobrevivência e reduzir a probabilidade de recorrência. Figura criada com Biorender.com. (Berek et al., 2017; González-Martín et al., 2014; Hacker & Rao, 2017; Lengyel, 2010)

A carboplatina é um composto de platina utilizado como quimioterápico no tratamento de diversos tipos de cancro, incluindo no CO (Colombo et al., 2019; Ford et al., 2020; Matulonis et al., 2016; Rickard et al., 2021). O seu mecanismo de ação envolve

a formação de ligações cruzadas no ácido desoxirribonucleico (DNA), resultando em apoptose celular (Nunes, Duarte, et al., 2023).

O paclitaxel é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de cancro, incluindo no CO, cancro da mama e cancro do pulmão. Ele atua como um inibidor mitótico, ligando-se à beta-tubulina e estabilizando os microtúbulos, o que impede a despolimerização e, conseqüentemente, a divisão celular (Bae et al., 2015; Das et al., 2021; Kelland, 2007; Mosca et al., 2021; Sobue et al., 2016; Song & Brady, 2015; Wloga et al., 2017). A importância do paclitaxel reside na sua capacidade de induzir a morte celular em tumores, especialmente em casos onde a quimioterapia é necessária para controlar a progressão da doença (González-Martín et al., 2014; Testa et al., 2018; Weidle et al., 2016).

Outras combinações de fármacos têm sido exploradas para melhorar a eficácia da quimioterapia adjuvante, incluindo carboplatina ou cisplatina com paclitaxel ou docetaxel, bem como o uso de gemcitabina, doxorrubicina lipossômica peguilada e agentes antiangiogênicos, como bevacizumab, pazopanib e nintedanib (Bois et al., 2009, 2016; Bookman et al., 2009; Burger et al., n.d.; Oliver & McGuire, 2014; Perren et al., 2011; Pignata et al., 2011; Vasey et al., 2004). Contudo, apesar dos benefícios iniciais, a maioria das pacientes eventualmente desenvolve resistência à quimioterapia (Berek et al., 2017). Ensaios clínicos randomizados exploraram diversas estratégias para superar a quimioresistência, incluindo a utilização de gemcitabina, topotecano e doxorrubicina lipossômica, mas a carboplatina permanece como o padrão terapêutico de primeira linha (Berek et al., 2017; Bookman et al., 2009).

A ivermectina é um antiparasitário amplamente utilizado no tratamento de infecções parasitárias, como oncocercose e linfaticofilariose (Nunes et al., 2020). Recentemente, estudos demonstraram que a ivermectina pode ter propriedades antitumorais, atuando como um quimosensibilizador (Nunes et al., 2020).

Para o tratamento de metástases peritoneais, que são comuns no CO, a administração intraperitoneal da quimioterapia tem apresentado resultados promissores (Berek et al., 2017). Estudos indicam que a quimioterapia intraperitoneal está associada a um aumento de 5,5 meses na SLP e 15,9 meses na SG em pacientes submetidos à cirurgia de citorredução otimizada em estadió III (Hess et al., 2007; *NEJMoa052985*, n.d.). No entanto, esta abordagem é limitada por complicações relacionadas ao uso de cateteres e pela necessidade de uma maior seleção de pacientes.

1.1.5. Quimioresistência

A quimioresistência refere-se à capacidade de as células tumorais adquirirem resistência aos medicamentos quimioterápicos, levando à falha no tratamento e à progressão da doença (Agarwal & Kaye, 2003; Jiang et al., 2021). A quimioresistência pode ser mediada por diversos mecanismos, incluindo alterações na expressão de genes que regulam a apoptose, modificações epigenéticas, e processos como a autofagia mitocondrial, que ajudam as células tumorais a sobreviver em condições adversas (Jiang et al., 2021; Z. Li et al., 2019; Y. Liu et al., 2020; Sun et al., 2023). Essas características tornam a quimioresistência um desafio significativo no tratamento oncológico, exigindo a exploração de novas abordagens terapêuticas para reverter este problema (Sun et al., 2023).

1.1.5.1. Marcadores Associados com a Resistência à Terapia

A P-glicoproteína (P-gp), também conhecida como proteína de resistência a múltiplos fármacos 1 (MDR1), é uma proteína transmembranar com função de bomba de efluxo, sendo essencial na regulação da farmacocinética de diversos medicamentos (Seelig, 2020). Esta proteína tem como papel principal o transporte de substâncias, incluindo agentes terapêuticos, para fora das células, o que pode resultar na resistência ao tratamento (C. H. Choi, 2005; Y. H. Choi & Yu, 2014; Seelig, 2020). A P-gp está amplamente expressa em diferentes tecidos, como nas células epiteliais do intestino, fígado e rins, onde desempenha um papel crucial na modulação da absorção, distribuição e excreção de fármacos, influenciando diretamente a sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica (C. H. Choi, 2005; Y. H. Choi & Yu, 2014).

No contexto oncológico, a sobreexpressão da P-gp em células tumorais constitui um dos mecanismos mais relevantes associados à resistência a diversos quimioterápicos, como é o caso do paclitaxel (C. H. Choi, 2005; Y. H. Choi & Yu, 2014). A sobreexpressão permite que a P-gp atue eficientemente no bombeamento de agentes quimioterápicos para fora das células tumorais, reduzindo a sua concentração intracelular e comprometendo o sucesso do tratamento (Abbasi et al., 2016; Lespine et al., 2006; Y. Li et al., 2018; Miyama et al., 1998; Prueksaritanont et al., 2014; Tapaninen et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado que a inibição ou modulação da atividade da P-gp pode aumentar a acumulação de fármacos no interior das células tumorais, revertendo, em alguns casos, a resistência e melhorando a resposta terapêutica. Dessa forma, a P-gp emerge como um alvo central na investigação de novas estratégias terapêuticas para

superar a resistência a múltiplos fármacos para usos oncológicos (C. H. Choi, 2005; Y. H. Choi & Yu, 2014).

A aldeído desidrogenase 1 (ALDH1), pertencente à superfamília das desidrogenases de aldeídos e é uma enzima citosólica que desempenha um papel crucial na oxidação de aldeídos intracelulares em ácidos carboxílicos, contribuindo para a metabolização e desintoxicação de substâncias endógenas e exógenas (O93-013, n.d.; Riveros-Rosas et al., 1997; Sophos & Vasiliou, n.d.). Esta enzima tem sido amplamente reconhecida como um marcador de células estaminais cancerígenas (CEC), devido à sua associação com processos de autorrenovação, diferenciação e quimiorresistência (Clay et al., 2010; Hellsten et al., 2011; Lin et al., 2011; Luo et al., 2012; Visus et al., 2007).

A atividade da ALDH1 tem sido correlacionada com a resistência a agentes quimioterápicos como a ciclofosfamida, uma vez que contribui para a proteção das células estaminais cancerígenas contra danos induzidos pelos fármacos (Chute et al., 2006). Vários estudos indicam que células ALDH1-positivas apresentam propriedades de autorrenovação e capacidade tumorigênica, sendo capazes de recapitular a heterogeneidade tumoral em modelos de xenotransplante (Douville et al., 2009). Essa característica torna a ALDH1 um biomarcador relevante para a identificação, isolamento e estudo de CEC em diversos tipos de cancro.

1.2. Técnicas Histológicas Aplicadas em Oncologia: O Papel dos *Tissue Microarrays* e *Cell Microarrays*

O *tissue microarray* (TMA) é uma técnica histológica que permite a análise simultânea de múltiplas amostras de tecido num único bloco de parafina, facilitando a avaliação da morfologia e composição molecular de diferentes amostras (Giltneane & Rimm, 2004; Kallioniemi et al., 2001; *Kononen1998*, n.d.). Esta abordagem foi desenvolvida inicialmente por Battifora em 1986 e aprimorada ao longo dos anos, culminando numa técnica que organiza as amostras num formato matriz, permitindo a visualização lado a lado sob um microscópio (*Kononen1998*, n.d.). Os TMAs são particularmente úteis para estudos oncológicos, pois possibilitam a avaliação da expressão de proteínas em diferentes contextos tumorais diminuindo os custos e o tempo de análise (Jensen et al., 2014; *Kononen1998*, n.d.; Kumar et al., 2004; Rubin et al., 2002). O *cell microarray* (CMA) é uma adaptação dos TMA que permitem a análise simultânea de múltiplas amostras citológicas (células em suspensão e não tecido) num único bloco de parafina (Andersson et al., 2006; Ferrer et al., 2005; Pu et al., 2008; Routila et al.,

2021; Waterworth et al., n.d.; Wen et al., n.d.). Essa metodologia é especialmente valiosa em oncologia, pois possibilita a avaliação de alterações na expressão de proteínas em resposta a diferentes tratamentos farmacológicos usados em ensaios com linhas celulares (Pu et al., 2008; Richani et al., 2006; Skacel et al., 2002). O CMA é construído a partir da extração de *cores* cilíndricos de diferentes blocos de parafina com amostras citológicas, que são reincorporados num bloco recetor, permitindo a análise de múltiplas condições experimentais de forma económica e eficiente (Figura 6) (Jensen et al., 2014; Kononen1998, n.d.; Rubin et al., 2002).



Figura 6. Construção do Cell Microarray. O bloco recetor contém os *cores* livres, que são áreas preparadas para receber a amostra do dador. No bloco dador retira-se uma pequena amostra, que será colocada nos *cores* livres do bloco recetor. Após a inserção da amostra no bloco recetor, o bloco de CMA já está construído, contendo as amostras dos blocos dadores. A lâmina é preparada, segue-se os protocolos pretendidos para avaliação e no final faz-se avaliação ao microscópio. CMA – *cell microarray*. Figura criada com Biorender.com. (Jensen et al., 2014; Kononen1998, n.d.; Rubin et al., 2002)

Num primeiro passo, as células são cultivadas sob condições específicas e, após a incubação, são recolhidas e fixadas em formol (Andersson et al., 2006). De seguida, faz-se a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliar a morfologia e a celularidade das amostras, permitindo a seleção das áreas representativas que serão incorporadas no bloco recetor (Kumar et al., 2004; Sergi, 2023). Os *cores* são extraídos e organizados em coordenadas definidas no bloco recetor, e o processo de homogeneização é crucial para garantir a adesão adequada dos mesmos à parafina (Sergi, 2023). É importante que os *cores* sejam dispostos de forma assimétrica para evitar erros de interpretação durante a observação microscópica, assim como a inclusão de *cores* controlo em posições estratégicas é recomendada para garantir a orientação correta durante o corte (Kumar et al., 2004).

1.2.1. Avaliação de Proteínas Associadas com Diferenciação (MSLN), Viabilidade (Ki67), Apoptose (caspase 3 clivada e PARP clivada)

A mesotelina (MSLN) é uma glicoproteína ancorada à membrana celular, com expressão predominante em células mesoteliais que revestem cavidades corporais como a pleura, o pericárdio e o peritoneu (Chang, Batra, et al., 1992). Em tecidos normais, a sua expressão é restrita às células mesoteliais, mas é marcadamente elevada em vários tipos de cancro, incluindo mesotelioma, CO, e cancros do pulmão, pâncreas, esôfago, estômago, vias biliares e endométrio (K. Chang, Batra, et al., 1992; Pastan & Hassan, 2014). Inicialmente sintetizada como uma proteína de 69 kDa, a MSLN é clivada pela protease furina, gerando um fragmento C-terminal de 40 kDa ancorado à membrana e um fragmento N-terminal solúvel de 32 kDa, conhecido como fator de potencialização megacariótico (K. Chang, Batra, et al., 1992; Pastan & Hassan, 2014).

A função biológica da MSLN parece não ser essencial em tecidos normais, conforme observado num estudo *in vivo* onde foram desenvolvidos ratinhos *knockout*, nos quais o gene da mesotelina foi inativado pela substituição pelo gene de resistência à neomicina e nem o mRNA da mesotelina nem o produto proteico foram detetados. Estes ratinhos apresentaram um desenvolvimento, fertilidade e contagem de células sanguíneas normais comparativamente com os ratinhos controlo. Concluindo que, a função da mesotelina não é essencial para o crescimento ou a reprodução dos ratinhos (Bera & Pastan, 2000; Hassan et al., 2004; Ordóñez, 2003). Contudo, a sua expressão aberrante está associada com a transformação maligna e à agressividade tumoral, promovendo proteção celular, invasão local e resistência à apoptose induzida por agentes citotóxicos (Kachala et al., 2014; Murakami et al., 2016; Rizk et al., 2012; Servais et al., 2012). A interação da MSLN com a mucina 16 (MUC16) facilita a adesão celular heterotípica, contribuindo para a metástase, especialmente no CO (Morello et al., 2016). A elevada expressão da MSLN em células tumorais está correlacionada com maior carga tumoral e pior prognóstico, destacando a sua relevância como alvo para terapias imunológicas, como as baseadas em recetores de antígenos quiméricos (Morello et al., 2016; Thomas et al., n.d.).

O Ki67 é uma proteína nuclear intrinsecamente ligada à toxicidade celular e extremamente reconhecida como um marcador confiável de proteção tumoral em estudos patológicos. Descoberta na década de 1980, esta proteína é expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), estando ausente na fase G0 (Gerlach et al., 1997; Hooghe et al., 2008; Scholzen & Gerdes, 2000; Shirendeb et al., 2009). Como indicador

prognóstico e preditivo, o Ki67 está diretamente associado com a atividade proliferativa das células tumorais, permitindo a avaliação da agressividade tumoral e a previsão de comportamento clínico em diversos tipos de cancro, incluindo o cancro da mama (Brown & Gatter, n.d.; Ciancio et al., 2012; Ishihara et al., 2013; Josefsson et al., 2012; Klöppel et al., 2004; Sorbye et al., 2012).

A expressão do Ki67 é frequentemente avaliada por meio de técnicas de imunohistoquímica (L. T. Li et al., 2015). Este índice de proliferação tem mostrado associação com o grau do tumor e a presença de metástases, representando um marcador essencial para a estratificação de risco e seleção terapêutica (Geyer et al., 2012; Karamitopoulou et al., 1998; Yerushalmi et al., 2010). Estudos sugerem que o efeito inibidor da expressão do Ki67 pode reduzir o padrão celular, destacando o seu potencial como alvo terapêutico em modelos experimentais (D'Angelo & Prat, 2010; Gentile et al., 2006; Iwata, 2011; Kroeze et al., 2010; Yu et al., 2002).

A caspase 3 clivada é uma protease executora essencial no processo de apoptose, ou morte celular programada, desempenhando um papel crítico na manutenção da homeostasia celular e na eliminação de células danificadas ou redundantes (Kuribayashi et al., 2006; Lei et al., 2022). Ativada por vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, a caspase 3 clivada promove alterações morfológicas e bioquímicas típicas da apoptose, como a fragmentação do DNA e a clivagem de proteínas específicas à sobrevivência celular (Beroske et al., 2021; Caspases 9 and 3 in Adenoid Cystic Carcinoma, n.d.; Eskandari & Eaves, 2022; Yadav et al., 2021). Após a sua sintetização como proenzima, é ativada por clivagem nas subunidades p17 e p12, que formam a enzima funcional responsável pela execução da cascata apoptótica (Hague et al., 2004; J.-S. Huang et al., n.d.; Y. Wang et al., 2018). Além disso, a caspase 3 clivada tem sido investigada como biomarcador em diversos tipos de cancro, incluindo no da cabeça e pescoço. Embora a sua expressão nem sempre influencie significativamente o prognóstico, alguns estudos indicam que pode estar associada com a progressão tumoral e resposta terapêutica (Andressakis et al., 2008; P. F. Liu et al., 2017).

A poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) é uma enzima essencial no reparo de quebras de cadeia simples no DNA, sendo ativada em resposta a danos no material genético (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). A principal isoforma, a PARP1, liga-se a lesões no DNA e catalisa a adição de cadeias de poli (ADP-ribose) a várias proteínas, incluindo XRCC1, que é fundamental no reparo de quebras de fita simples (Benjamin & Gill, 1980; El-Khamisy et al., 2003; Fisher et al., 2007; Okano et al., 2003). A clivagem

da PARP ocorre em resposta a danos severos no DNA, ativando a enzima e recrutando fatores de reparação para manter a integridade genómica (Slade, 2020).

Além da sua participação na reparação do DNA, a PARP clivada regula a estabilidade das forquilhas de replicação e a resposta ao stresse celular (Feng et al., 2015; Weaver & Yang, 2013). Inibidores da PARP, como o olaparib, bloqueiam a sua atividade, resultando numa acumulação de danos no DNA, particularmente em células com deficiência nos genes BRCA1 e BRCA2, o que leva à morte celular por letalidade sintética, explorada terapêuticamente em diversos tipos de cancros (Amé et al., 1999; Galluzzi et al., 2018).

2. Objetivos

O objetivo principal deste estágio de natureza profissional foi explorar a expressão de diversos biomarcadores após tratamento com carboplatina e paclitaxel quando combinado com drogas reaproveitadas (ivermectina) utilizando a abordagem de CMA.

Os objetivos específicos foram:

1. Construir o CMA utilizando duas linhas celulares de CO, uma resistente à carboplatina (OVCAR8) e outra resistente à carboplatina e paclitaxel (OVCAR8 PTX R C). Estas linhas celulares foram submetidas a tratamento com carboplatina, paclitaxel, e respectivas combinações com ivermectina. Após o tratamento as células são recolhidas, fixadas em formol e incluídas em parafina, para avaliação das alterações moleculares provocadas pelos tratamentos.
2. Avaliar a expressão de marcadores associados à quimiorresistência, particularmente o ALDH1 e a P-gp, proliferação celular (Ki67), apoptose (caspase 3 clivada e PARP clivada) e células tumorais (MSLN) através da técnica de imunocitoquímica.

3. Material e Métodos

3.1. Linhas Celulares e Condições de Cultura

As linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C foram selecionadas como modelos de CSAG, particularmente porque são descritas como sendo resistentes à carboplatina (Schilder1990, n.d.) e à carboplatina e paclitaxel (Nunes et al., 2021) respetivamente. A linha celular OVCAR8 foi estabelecida pelo Schilder *et al*, a partir de uma paciente com CSAG que apresentava doença progressiva após o tratamento com elevadas doses de carboplatina (Schilder1990, n.d.) e foi gentilmente fornecida pelo Dr. Francis Jacob (Gynecological Cancer Center and Ovarian Cancer Research, Department of Biomedicine, University Hospital Basel and University of Basel, Basel, Switzerland).

No nosso grupo de investigação surgiu o interesse por um modelo duplamente resistente aos quimioterápicos mais utilizados em pacientes com CSAG, especificamente, a carboplatina e o paclitaxel. Uma vez que, até a data não estavam descritas linhas celulares de CSAG com esta dupla resistência, surgiu a necessidade de induzir a resistência ao paclitaxel numa linha celular originalmente resistente à carboplatina (OVCAR8). Assim, a OVCAR8 PTX R C foi desenvolvida, no nosso laboratório, a partir da linha OVCAR8 através da exposição contínua a doses crescentes de paclitaxel durante 3 meses (Nunes et al., 2021).

As linhas celulares foram mantidas em meio de cultura completo, ou seja, RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal de bovino inativado e filtrado, e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (ThermoFisher Scientific), e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Ambas as linhas celulares foram testadas quanto à ausência de micoplasma.

Para descongelar as linhas celulares, os *criovials* foram retirados da arca a -80 °C, rapidamente descongelados em meio de cultura completo aquecido (37 °C) e centrifugados (1200 rpm, durante 5 minutos à temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspensionado em meio de cultura completo aquecido, transferido para um frasco de cultura e incubadas a 37 °C com 5% CO₂.

Quando as linhas celulares atingiram cerca de 80% de confluência, procedeu-se à tripsinização. Para separar as células aderidas aos frascos de cultura, o meio de cultura foi descartado, lavou-se as células com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x (soluções Grisp Research, Porto, Portugal), adicionou-se tripsina-EDTA 0,05% (ThermoFisher Scientific) e incubou-se durante 5 minutos a 37 °C com 5% de CO₂. Após estarem totalmente destacadas, a tripsina-EDTA foi neutralizada através da adição de

meio de cultura completo e as células foram centrifugadas (1200 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente). Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de células em meio de cultura completo aquecido, transferiu-se para um frasco de cultura e incubou-se a 37 °C com 5% CO₂.

Para criopreservação das linhas celulares, ressuspendeu-se o *pellet* de células em soro fetal de bovino inativado e filtrado com 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (AppliChem, Barcelona, Espanha), transferiu-se para os *criovials* e incubou-se a -80 °C.

3.2. Ensaios com Tratamentos Oncológicos nas Linhas Celulares

As células foram cultivadas em dois métodos de cultura: 2D (cultura em monocamada) e 3D (cultura tridimensional). Primeiro, as linhas celulares (OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C) foram plaqueadas em placas de 6 poços à concentração de 1×10^5 células por poço em meio de cultura completo e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ (A). Após 96 horas, as células foram tratadas com as diferentes fármacos, incluindo o branco (RPMI completo), o controlo (RPMI completo + células + 1% de DMSO) e os tratamentos tanto num esquema único (carboplatina, paclitaxel ou ivermectina) como em combinação (carboplatina + ivermectina, paclitaxel + ivermectina) à concentração dos valores de IC₅₀ de cada droga (150µm de carboplatina; 10 nm de paclitaxel; 15µm de ivermectina) e incubadas nas mesmas condições (Figura 7B). Após 72 horas, as células foram recolhidas. Para as células cultivadas em 2D, removeu-se o meio de cultura, raspou-se as células com um *cell scraper* e recolheu-se tudo. Para as células cultivadas em 3D, as células suspensas no meio de cultura são recolhidas diretamente (Figura 7C). Tanto para as células cultivadas em 2D e 3D, realizou-se 2 lavagens ao poço com uma solução salina tamponada com fosfato para garantir a recolha do maior número possível de células e centrifugou-se a 1200 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi submetido a três lavagens sequenciais com uma solução salina tamponada com fosfato, e centrifugou-se nas mesmas condições descritas anteriormente (Figura 7D).

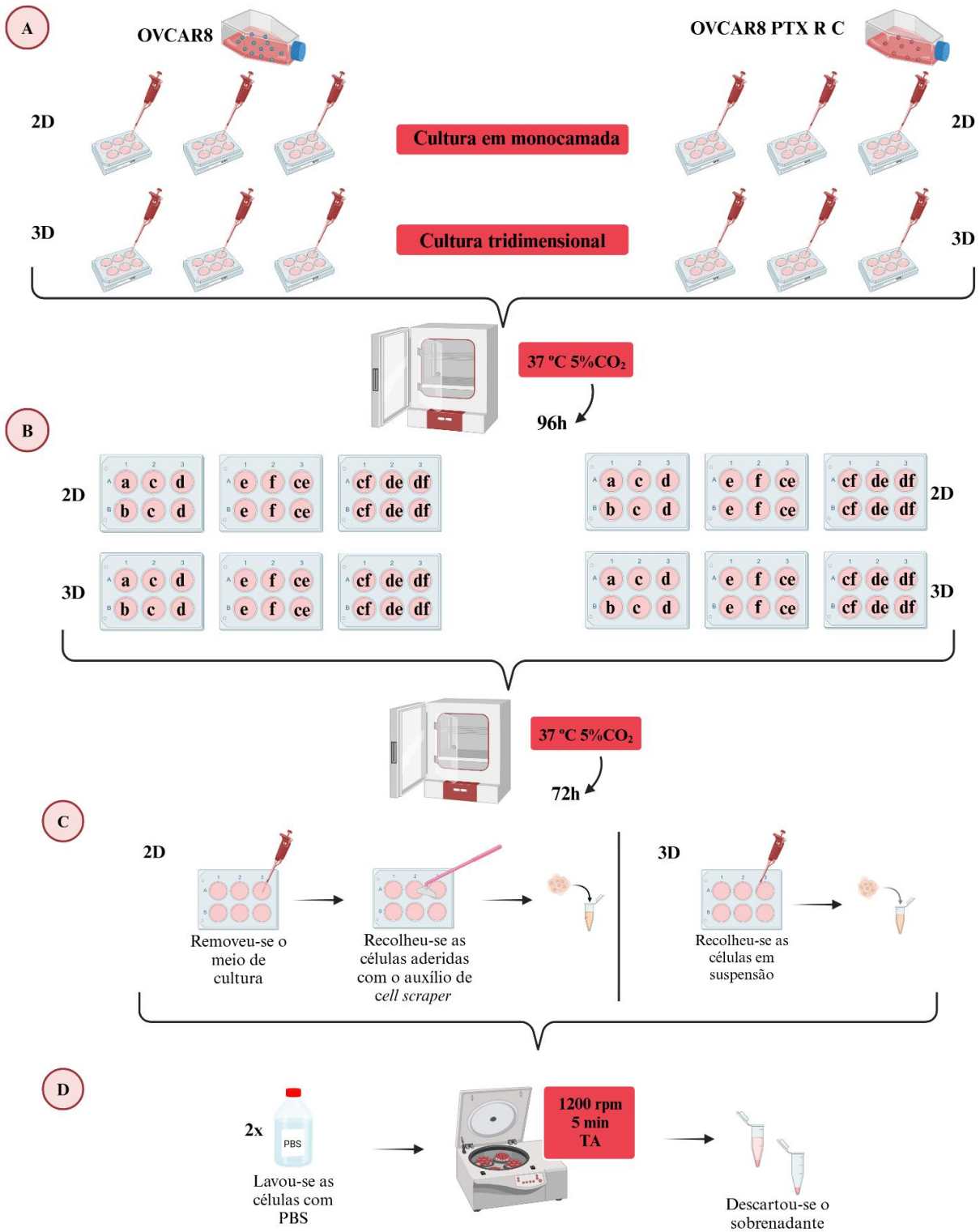


Figura 7. Tratamento com as drogas. (A) Colocou-se 1×10^5 células por poço em meio de cultura completo em duplicado, (B) As células foram tratadas com diferentes drogas e combinações (a) Branco, (b) Controlo com o veículo das drogas, (c) Carboplatina, (d) Paclitaxel, (e) Pitavastatina, (f) Ivermectina, (ce)

Carboplatina + Pitavastatina, (cf) Carboplatina + Ivermectina, (de) Paclitaxel + Pitavastatina, (df) Paclitaxel + Ivermectina.), (C) Células recolhidas, e (D) Células lavadas.

Todos as drogas (carboplatina, paclitaxel e ivermectina) foram adquiridas na Selleckchem (Houston, TX, EUA), dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO; AppliChem, Barcelona, Espanha) ou água destilada e armazenados a -80 °C, de acordo com as instruções do fabricante. Imediatamente antes da utilização, uma alíquota foi diluída nas concentrações requeridas.

3.3. Processamento Histológico

Após a centrifugação referida anteriormente, o *pellet* de células foi fixado em 10% (v/v) formalina tamponada neutra (AppliChem, Darmstadt, Germany) durante 24 horas (Figura 8A). De seguida, procedeu-se à centrifugação a 2800 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente (Figura 8B). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células embebido em Histogel™ (ThermoFisher Scientific) e centrifugado a 4000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente (Figura 8C-E). As células embebidas em Histogel™ foram incubadas a 4°C durante 10 minutos, colocadas em cassetes histológicas e submetidas ao processamento histológico padrão (Figura 8F-H). Detalhadamente, procedeu-se à desidratação com uma série ascendente de álcoois, a diafanização com xilol e, por fim, a impregnação e inclusão em parafina (Figura 8I). Procedeu-se ao desbaste do bloco para remover o excesso de parafina e realizaram-se cortes com 3 e 4 µm de espessura (Figura 8J). Por fim, as lâminas foram incubadas a 62°C durante 30 minutos, garantindo a adesão completa da amostra à lâmina e à sua desidratação total (Figura 8L). Após o corte, as lâminas foram coradas com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) permitindo a visualização da morfologia das células. Brevemente, após a desparafinação, realizou-se a hidratação, que transforma o tecido de um estado hidrofóbico para um estado hidrofílico, uma condição indispensável para a penetração dos corantes aquosos. Essa fase é conduzida numa série de soluções alcoólicas com concentrações decrescentes [100% (v/v) – 96% (v/v) – 70% (v/v) – 50% (v/v)] e finalizada em água corrente.

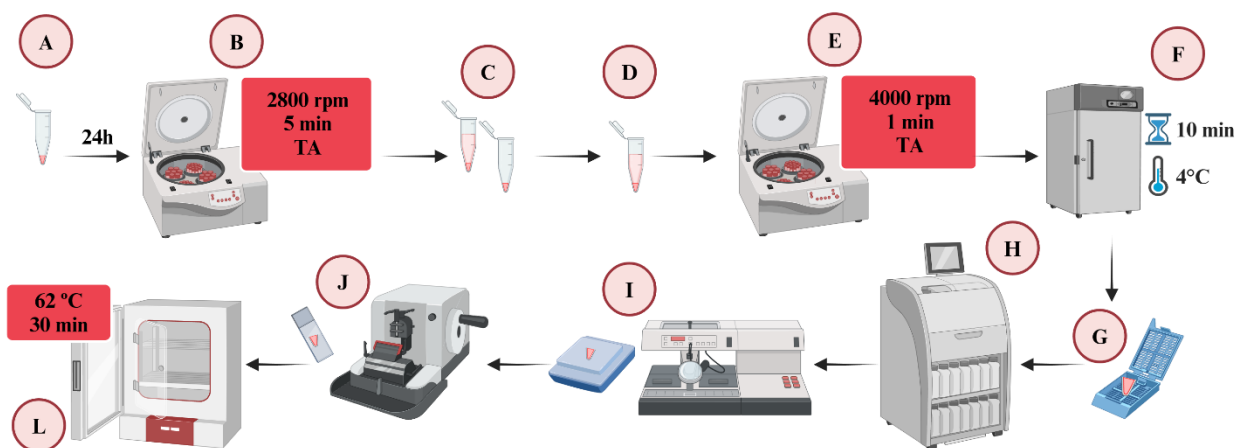


Figura 8. Processamento histológico do histogel™. (A) As células foram fixadas em 10% (v/v) formalina tamponada neutra, (B) Centrifugou-se as células, (C) Descartou-se o sobrenadante, (D) Pellet de células embebido em histogel™, (E) Centrifugou-se as células, (F) Células incubadas, (G) Células colocadas em cassetes histológicas, (H) Células submetidas ao processo padrão, (I) Inclusão das células em parafina, (J) Corte histológico, (L) Cortes a secar na estufa.

A coloração propriamente dita iniciou-se com a hematoxilina, que cora os núcleos celulares de azul ou roxo, destacando as estruturas nucleares (Feldman & Wolfe, 2014; Fischer et al., 2008), seguida de uma lavagem em água corrente e água amoniacal para intensificação da cor. Posteriormente, realizou-se uma imersão em álcool a 96% (v/v) e à coloração com a eosina, que destaca as estruturas citoplasmáticas e extracelulares, proporcionando uma coloração rosada ao citoplasma e criando um contraste claro entre este e os núcleos, previamente corados pela hematoxilina (Feldman & Wolfe, 2014; Fischer et al., 2008). Após a coloração, procedeu-se à desidratação para remover a água residual em álcoois de concentrações crescentes [70% (v/v) – 95% (v/v) – 100% (v/v)]. Seguiu-se a diafanização, uma etapa necessária para ser compatível com o meio de montagem. Finalmente, realizou-se a montagem das lâminas utilizando para isso um meio de montagem Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), aplicando-se uma gota sobre a amostra e cobrindo-o com uma lamela de tamanho adequado. Esse processo final assegura a preservação das amostras e permite uma visualização clara e duradoura ao microscópio.

3.4. Construção do *Cell Microarray*

Dois blocos recetores com capacidade para 40 cores (3 mm de diâmetro por core) cada, foram obtidos através da utilização de um molde de silicone (Arraymold Kit A, IHC

World LLC, MD, EUA) com parafina líquida e numa cassete de histologia. Os blocos recetores foram colocados numa placa fria e desenformados assim que a parafina solidificou completamente. Ambos os blocos de CMA (DRUG OVCAR8 2024 e DRUG OVCAR8 PTX R C 2024) foram construídos colocando os *cores* cilíndricos retirados dos blocos dadores, nos blocos recetores com o auxílio de uma agulha de biópsia dérmica (diâmetro entre 0,6 e 4,0 mm; Arraymold Kit A, IHC World LLC). Este processo foi repetido várias vezes a partir de diferentes blocos dadores até que todos os *cores* foram colocados nos blocos recetores em coordenadas específicas para identificação da amostra. Além disso, *cores* de tecidos (placenta e tumor do ovário) foram incluídos para orientação e controlo. Assim que os blocos de CMA foram todos preenchidos com as amostras, inverteu-se numa lâmina de vidro limpa e incubados numa estufa a 37 °C durante a noite para facilitar a aderência dos *cores* dadores à parafina do bloco recetor. A fusão adequada da parafina entre os *cores* e o bloco recetor é uma etapa crítica que deve ser realizada com cuidado para evitar deformações. No dia seguinte, procedeu-se com a homogeneização com 3 ciclos à temperatura ambiente e a 37 °C (durante 1 hora cada). Ao fim de 6 horas, os blocos de CMA foram aquecidos a 60 °C com uma lâmina de vidro na superfície para uma homogeneização final. Os blocos de CMA foram seccionados com 2-4 µm de espessura, colocados em lâminas de vidro revestidas (Superfrost Plus®, ThermoFisher Scientific), e incubados a 37 °C para aderência da secção. Por fim, realizou-se a coloração com H&E em cada 10 cortes com o intuito de controlar a morfologia e verificar o tamanho das amostras (Figura 9).

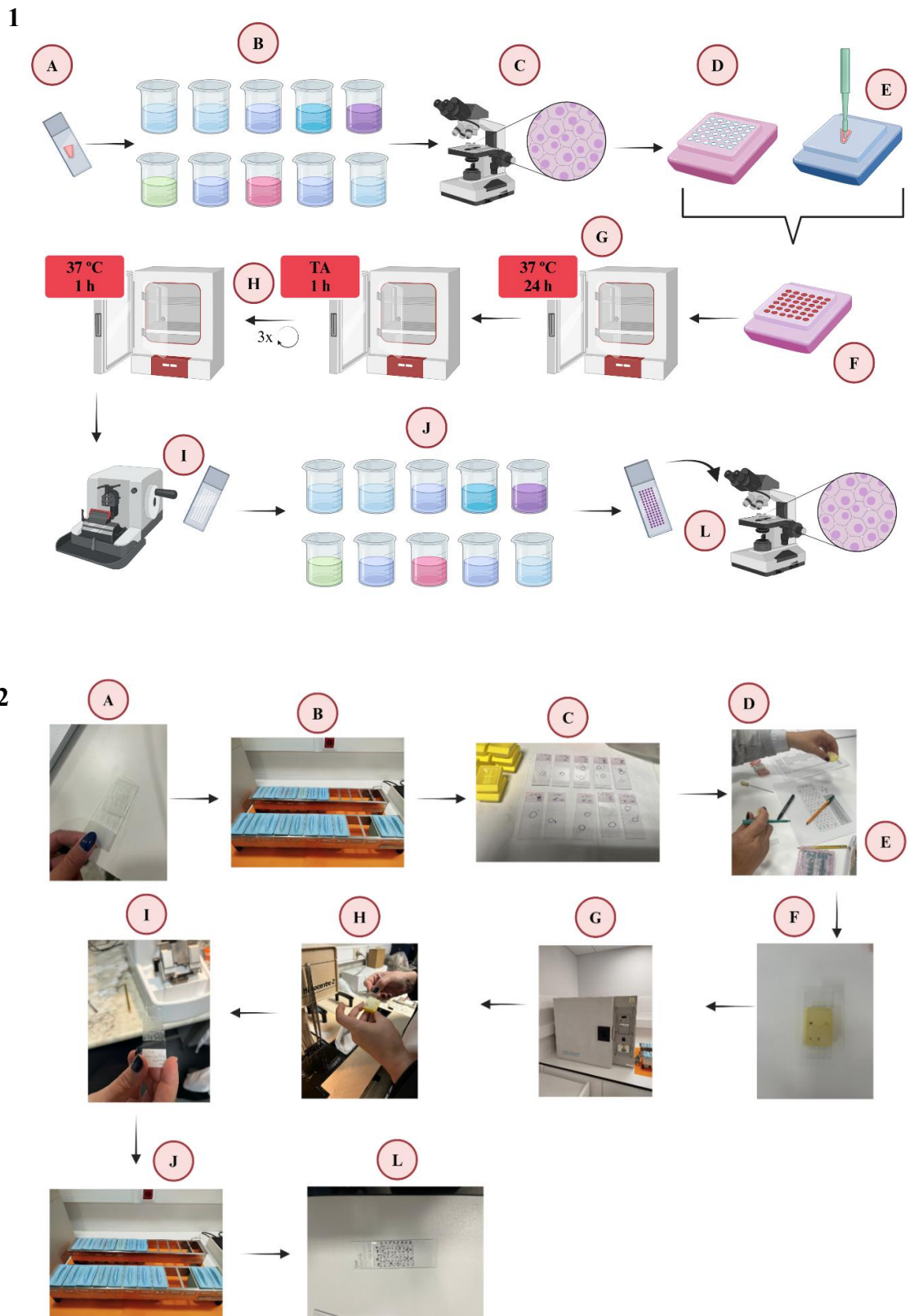


Figura 9. Construção do *Cell Microarray*. (A1) e (A2) Lâmina com as células, (B1) e (B2) Coloração hematoxilina e eosina, (C1) e (C2) Visualização ao microscópio para escolha de melhor sítio para se fazer o *core*, (D1-E1) e (D2-E2) Fez-se os *cores* nos blocos dadores e colocou-se no recetor, (F1) e (F2) Bloco de CMA construído, (G1-H1) e (G2-H2) Ciclos de homogeneização, (I1) e (I2) Corte histológico, (J1) e (J2) Coloração com hematoxilina e eosina; (L1) e (L2) Lâmina pronta a ser observada ao microscópio

É importante que os núcleos sejam dispostos de forma assimétrica para evitar erros de interpretação durante a observação microscópica, e a inclusão de núcleos de controle em posições estratégicas é recomendada para garantir a orientação correta durante o corte e também para o controle experimental (Kumar et al., 2004).

3.5. Avaliação da Expressão das Proteínas

Para este estudo a imunocitoquímica (ICC) foi realizada com o EnVision FLEX Mini Kit, pH elevado (Agilent Dako, Santa Clara, CA, EUA), com o objetivo de avaliar a expressão das proteínas associadas a processos celulares como apoptose, proliferação e resistência. Iniciou-se com desparafinação e hidratação das lâminas. Essa fase é conduzida numa série de soluções alcoólicas com concentrações decrescentes [100% (v/v) – 96% (v/v) – 70% (v/v) – 50% (v/v)] e finalizada em água corrente. Procedeu-se à recuperação antigénica induzida pelo calor (98 °C) com a EnVision FLEX Target Retrieval Solution high pH (1x) (EnVision FLEX Mini Kit, High pH), durante 40 minutos. De seguida, deixaram-se as lâminas a arrefecer durante 20 minutos e foram posteriormente lavadas com uma solução tampão (EnVision FLEX Mini Kit, High pH), por 3 vezes durante 2 minutos. Em seguida, colocou-se a caneta hidrofóbica (Advanced PAP PEN, Daido Sangyo Co., Ltd, Japan) para delinear a área de corte pretendida, e a atividade das peroxidases endógenas foi bloqueada com o reagente de bloqueio da peroxidase EnVision FLEX (EnVision FLEX Mini Kit, pH elevado), durante 10 minutos à temperatura ambiente numa câmara húmida. As lâminas foram lavadas como mencionado anteriormente e incubadas com os anticorpos monoclonais: caspase 3 clivada (1:100, D175 5A1E, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), P-gp (1:1200, ERP10364-57, Cell Marque Corporation, Sigma-Aldrich, Rocklin, CA, USA), Ki67 (1:100, SP6, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), PARP clivada (1:100, Asp214 D64E10, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), ALDH1 (1:200, D9Q8E, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), e Mesotelina (1:50, SP74, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) durante 1 hora à temperatura ambiente numa câmara húmida. A deteção dos anticorpos primários foi efetuada com EnVision FLEX HRP (EnVision FLEX Mini Kit, pH elevado), um anticorpo secundário conjugado com um polímero marcado com peroxidase de rábano (HRP), durante 30 minutos à temperatura ambiente numa câmara húmida. A visualização das reações foi obtida com a mistura do tampão de substrato EnVision FLEX e a diaminobenzidina (DAB) EnVision

FLEX (EnVision FLEX Mini Kit, pH elevado), de acordo com as instruções do fabricante. Para realçar o contraste nuclear, realizou-se uma coloração com hematoxilina. Após a coloração, procedeu-se à desidratação para remover a água residual em álcoois de concentrações crescentes [70% (v/v) – 95% (v/v) – 100% (v/v)]. Seguiu-se a diafanização, uma etapa necessária para ser compatível com o meio de montagem. Finalmente, realizou-se a montagem das lâminas utilizando para isso um meio de montagem Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), aplicando-se uma gota sobre a amostra e cobrindo-o com uma lamela de tamanho adequado (Figura 10).

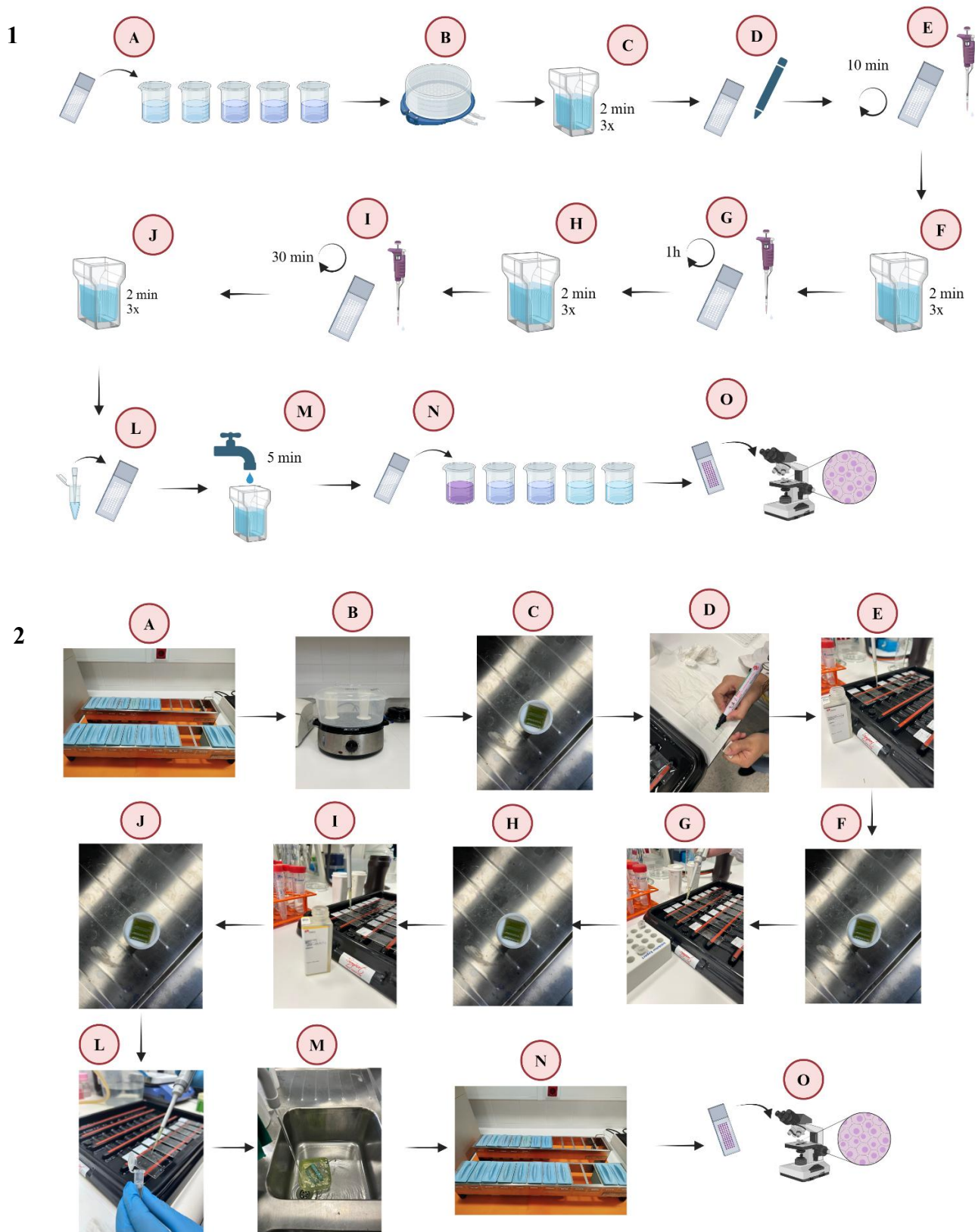


Figura 10. Avaliação da expressão das proteínas através da técnica da imunocitoquímica, (A1) e (A2) Desparafinação, (B1) e (B2) Recuperação antigênica, (C1) e (C2) Lavagens com solução tampão, (D1) e (D2) Caneta hidrofóbica, (E1) e (E2) Peroxidase, (F1) e (F2) Lavagens com solução tampão, (G1) e (G2)

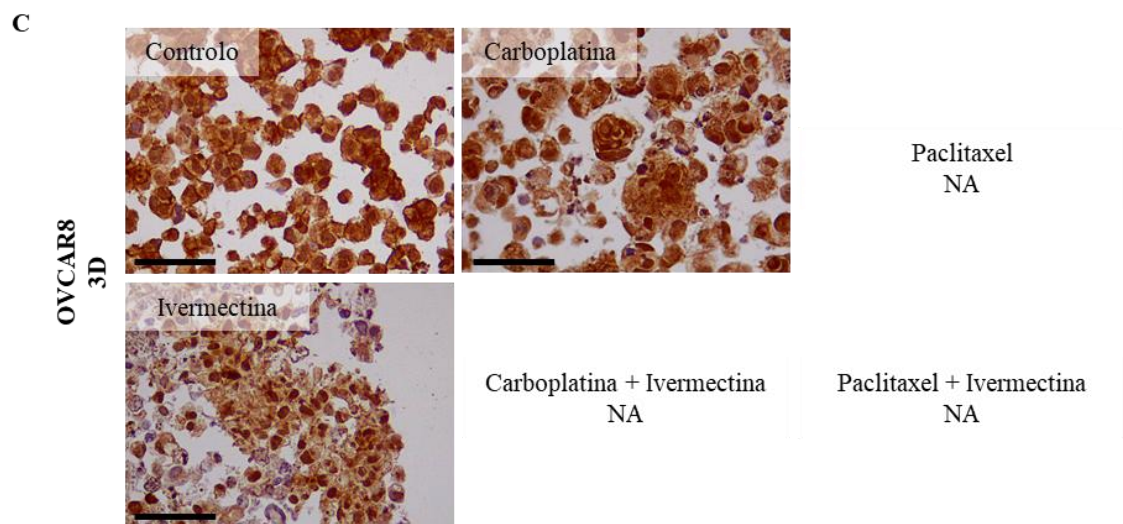
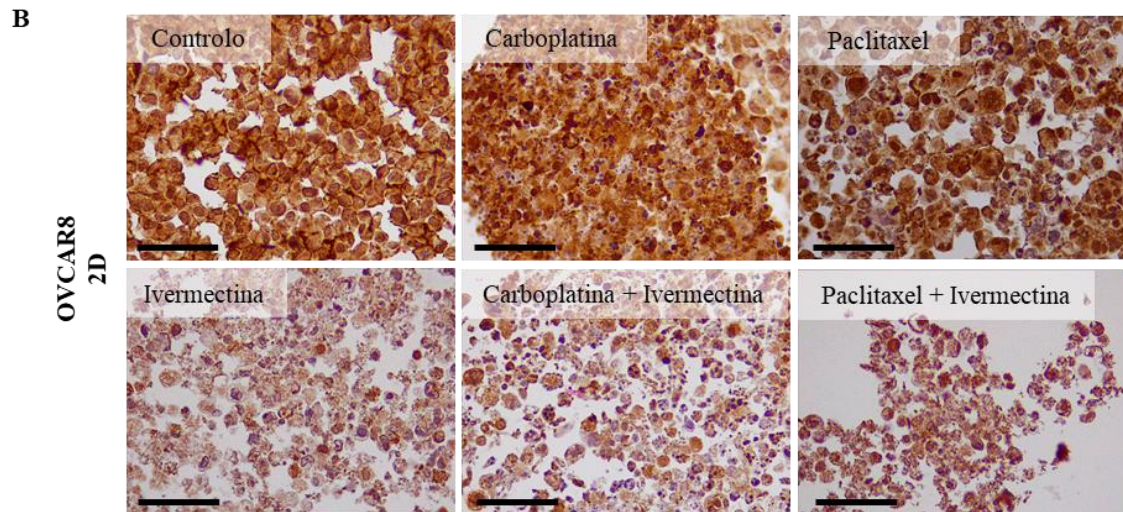
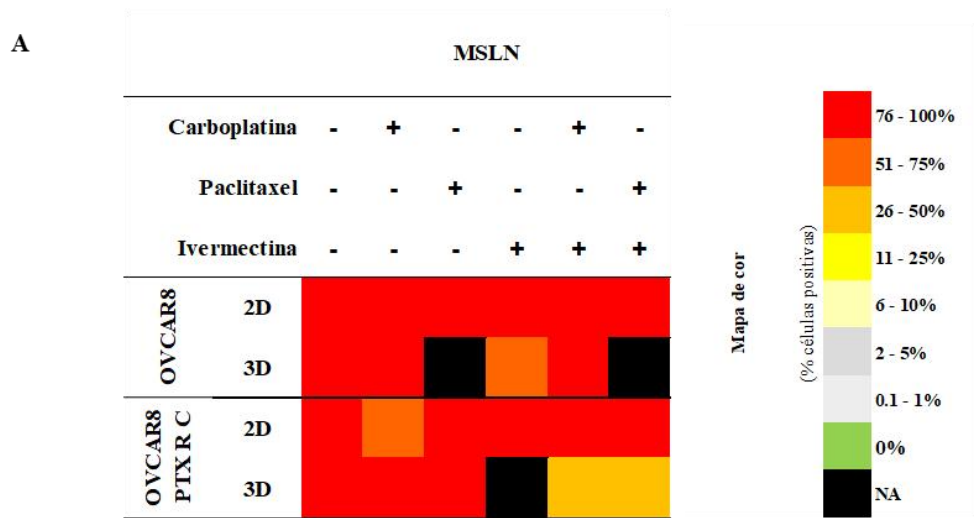
Anticorpo monoclonal, (H1) e (H2) Lavagens com solução tampão, (I1) e (I2) Anticorpo secundário, (J1) e (J2) Lavagens com solução tampão, (L1) e (L2) Diaminobenzidina (DAB) EnVision FLEX, (M1) e (M2) Lavagem em água corrente, (N1) e (N2) Contraste nuclear, (O1) e (O2) Visualização ao microscópio.

A avaliação dos biomarcadores foi realizada por 4 observadores independentes, nomeadamente a Doutora Sara Ricardo, Dr. Érica Oliveira, Dr. Cláudia Santos e Aran Sanfeliu. Registou-se o padrão de coloração (nuclear, citoplasmática ou membranar) e a percentagem de células coradas: negativo (0%) e positivo (0.1 – 1%, 2 – 5%, 6 – 10%, 11 – 25%, 26 – 50%, 51 – 75% e 76 – 100%). Algumas amostras apresentaram pelo menos uma ICC não avaliável (NA) por baixa celularidade ou amostra ausente. Todas as figuras microscópicas foram obtidas pelo microscópio Leica DMi1 de contraste de fase invertida (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) com magnificação de 400x.

4. Resultados

4.1. A Expressão da Mesotelina Diminui na Linha Celular OVCAR8 PTX R C Quando Tratada em Combinação com a Ivermectina

Na avaliação da MSLN observa-se predominantemente uma marcação membranar nas células tumorais, refletindo a sua ancoragem à superfície celular. Em alguns casos, observa-se também uma marcação citoplasmática difusa, associada à presença de fragmentos desta proteína neste compartimento celular. A expressão da MSLN é elevada na maioria das condições de cultura (51-75% ou >75% de células positivas), no entanto, é visível uma diminuição da sua expressão para a OVCAR8 PTX R C quando cultivadas em 3D e expostas à combinação de quimioterápicos + ivermectina (26-50% de células positivas) (Figura 11).



(Cont.)

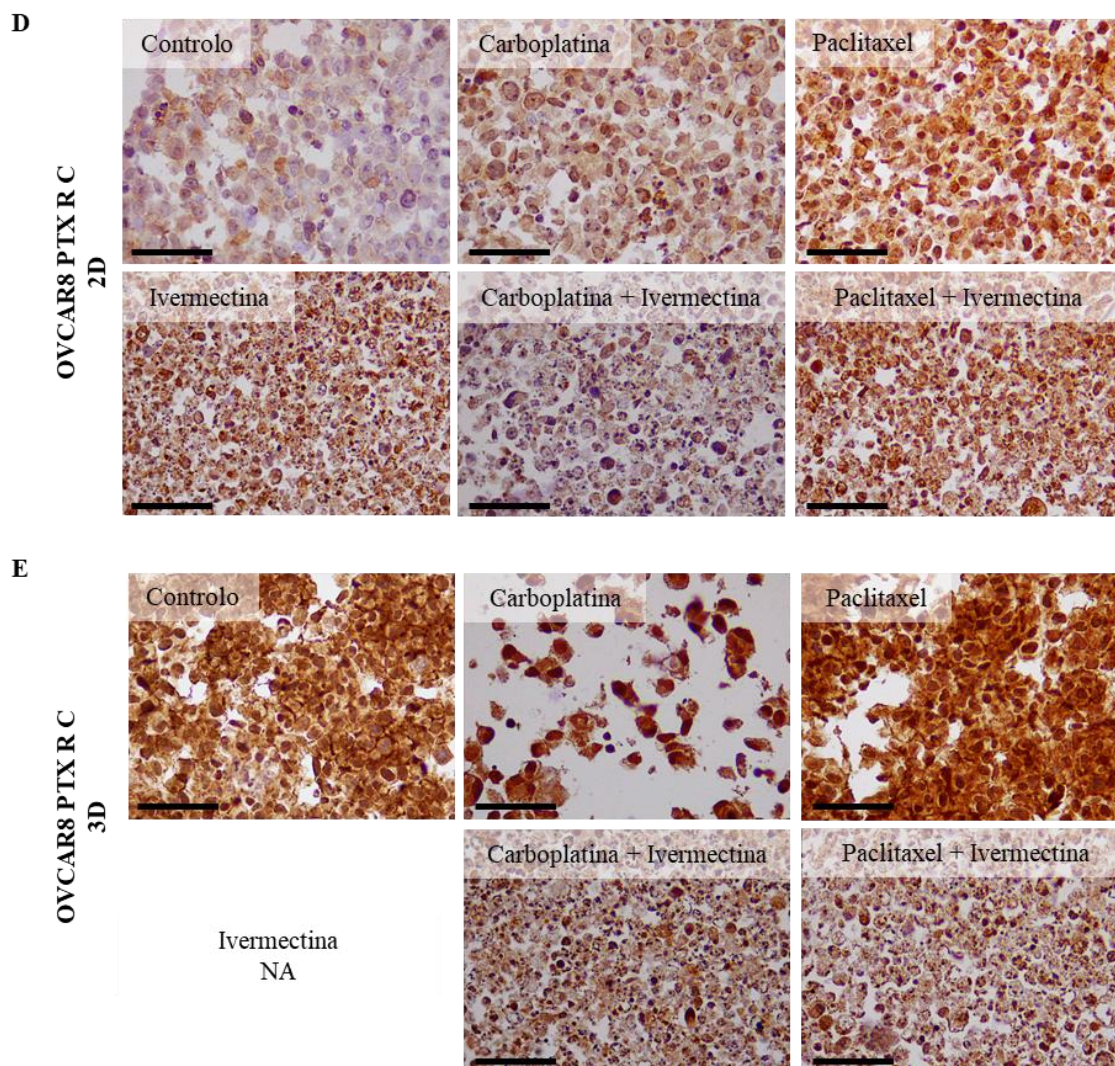
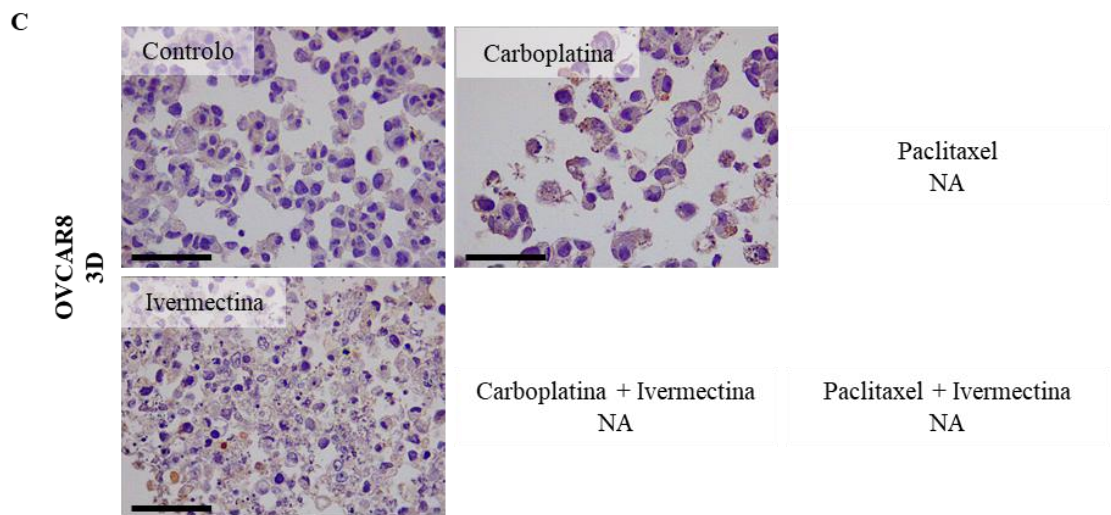
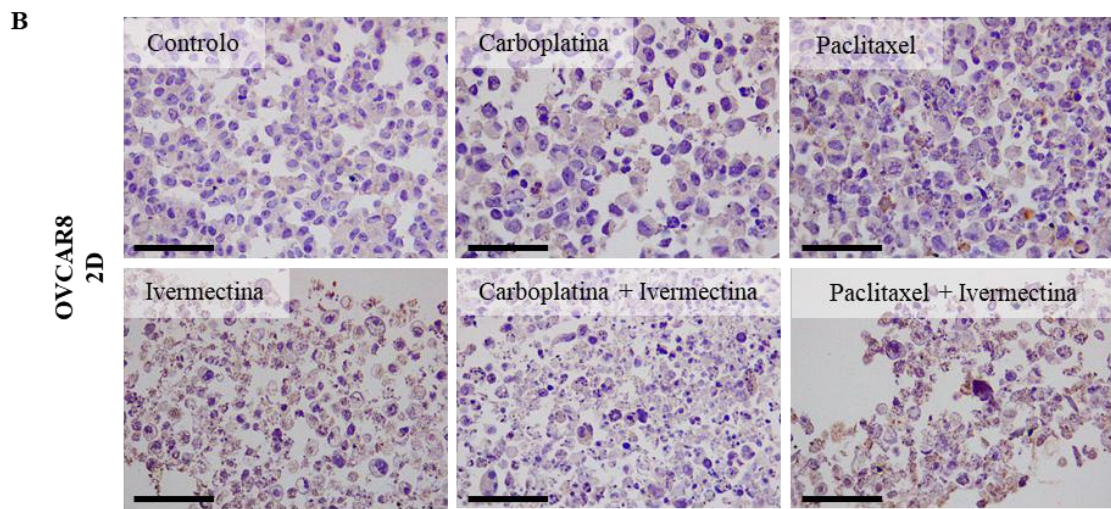
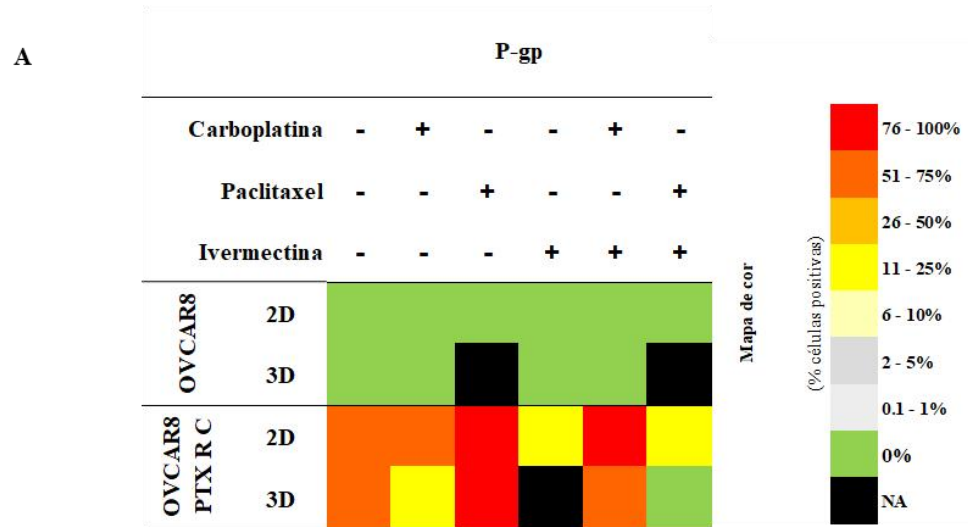


Figura 11. Expressão da mesotelina diminui na linha celular OVCAR8 PTX R C tratadas em combinação com a ivermectina. (A) Mapa de calor representando a percentagem de células marcadas e (B - E) imagens ICC representativas da expressão de MSLN em células OVCAR8 (B e C) e OVCAR8 PTX R C (D e E) tratadas com Carboplatina ou Paclitaxel isoladamente e em combinação com Ivermectina. Todas as imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400× e a barra de escala representa 50 µm. NA, não avaliável; MSLN, mesotelina.

De notar que, em algumas condições de cultura (OVCAR8 em 3D tratadas com paclitaxel e com a combinação de paclitaxel + ivermectina; OVCAR8 PTX R C em 3D tratadas com ivermectina), não foi possível obter um *pellet* com quantidade suficiente de células para avaliação por ICC, sendo consideradas NA (não avaliável). Esta situação é transversal na análise dos biomarcadores subsequentes neste trabalho sendo posteriormente discutida.

4.2. A Ivermectina Diminui a Expressão da P-gp na Linha Celular OVCAR8 PTX R C

Nas células OVCAR8, a expressão de P-gp é inexistente (0% de células positivas) tanto em condições 2D como 3D e o tratamento não modifica a sua expressão, sugerindo que o seu fenótipo continua a ser sensível a fármacos substratos desta proteína membranar, como, por exemplo, o paclitaxel (Figura 12).



(Cont.)

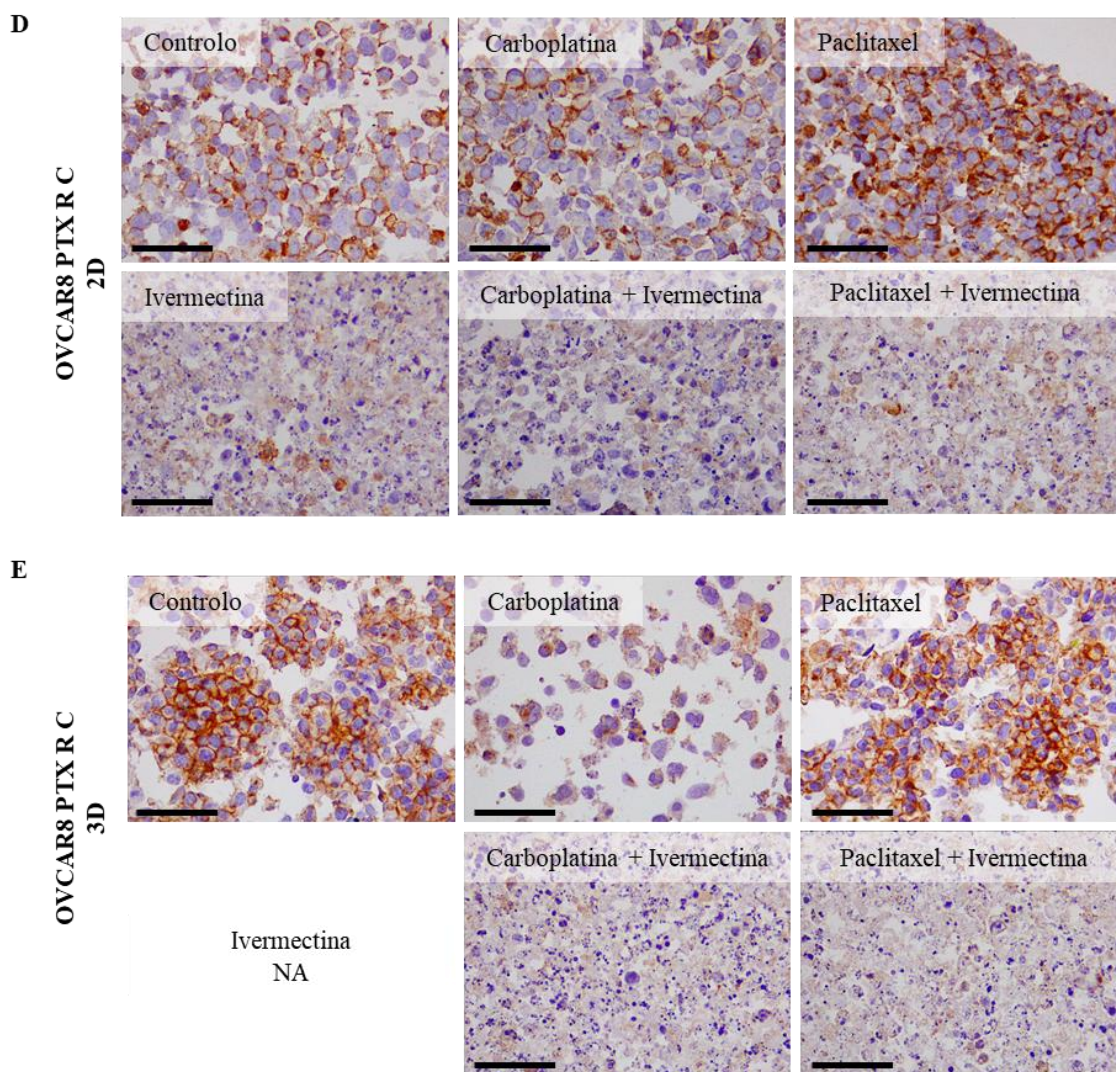


Figura 12. Expressão de P-gp após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C. (A) Mapa de calor representando a percentagem de células marcadas e (B - E) imagens ICC representativas da expressão de P-gp em células OVCAR8 (B e C) e OVCAR8 PTX R C (D e E) tratadas com Carboplatina ou Paclitaxel isoladamente e em combinação com Ivermectina. Todas as imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400× e a barra de escala representa 50 µm. NA, não avaliável; P-gp, p-glicoproteína.

Em contraste, na linha celular OVCAR8 PTX R C, em culturas 2D, a expressão da P-gp nas condições não tratadas e com o tratamento de carboplatina apresentam cerca de 26-50% de células marcadas, enquanto com tratamento de paclitaxel isolado e a combinação de carboplatina + ivermectina, as células exibem uma marcação superior a 75%. Os tratamentos com ivermectina isoladamente e paclitaxel + ivermectina apresentam uma menor marcação (11-25% de células positivas). Para a condição 3D, o controle e a combinação de carboplatina + ivermectina apresentam uma marcação com

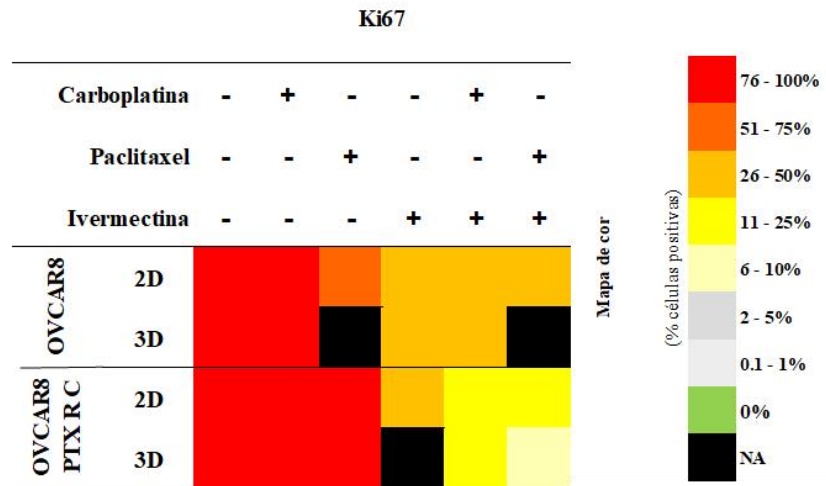
26-50% das células positivas para a P-gp. A monoterapia com carboplatina entre 11-25%, a monoterapia com paclitaxel acima de 75%, enquanto a combinação paclitaxel + ivermectina apresenta ausência de marcação. Nas células com monoterapia de ivermectina isolada não foi possível avaliar (NA) por ausência de amostra.

4.3. A Proliferação Diminuiu e a Apoptose Aumentou em Ambas as Linhas Celulares Quando Tratadas com Ivermectina

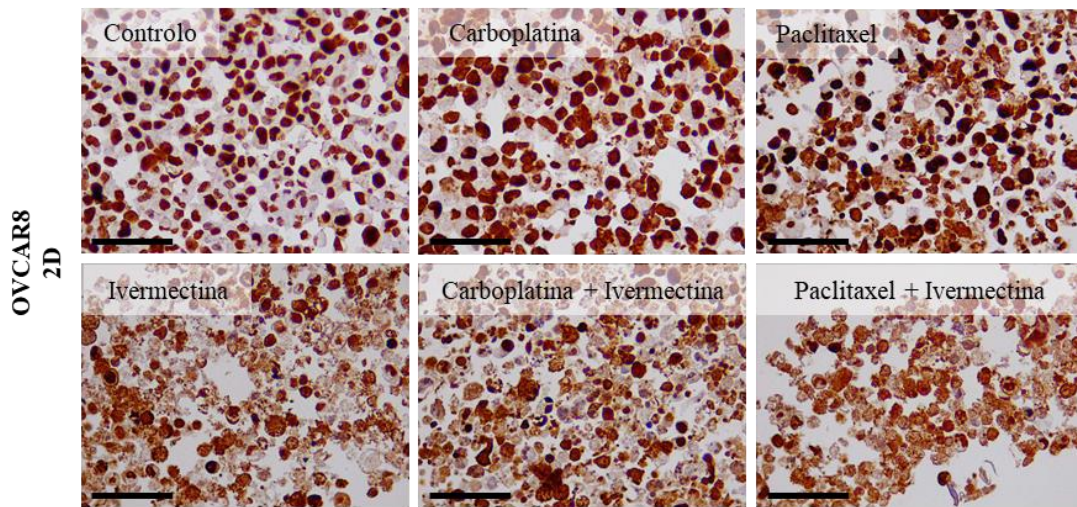
Para avaliar a citotoxicidade de todas as condições de cultura, foi avaliada a expressão da Ki67 (marcador de proliferação celular), caspase 3 clivada e PARP clivada, dois marcadores de apoptose por duas vias de ativação de morte celular distintas.

Nas células OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C, foram observados elevados níveis de expressão da Ki67 com os tratamentos de carboplatina e paclitaxel isoladamente (51-75% e >75%, respectivamente, de células positivas), tanto em condições 2D como 3D. No entanto, o tratamento com ivermectina diminuiu o índice de proliferação celular quer em monoterapia (OVCAR8 26-50%; OVCAR8 PTX R C 26-50%) quer em combinação com o paclitaxel (OVCAR8 2D 26-50%; OVCAR8 PTX R C 2D 11-25%; OVCAR8 PTX R C 3D 6-10%) ou carboplatina (OVCAR8 26-50%; OVCAR8 PTX R C 11-25%) (Figura 13).

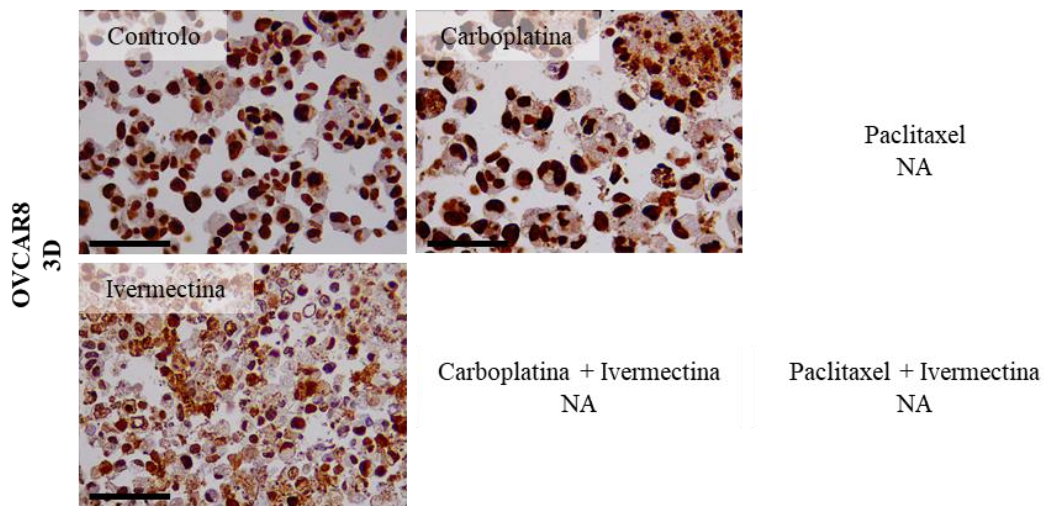
A



B



C



(Cont.)

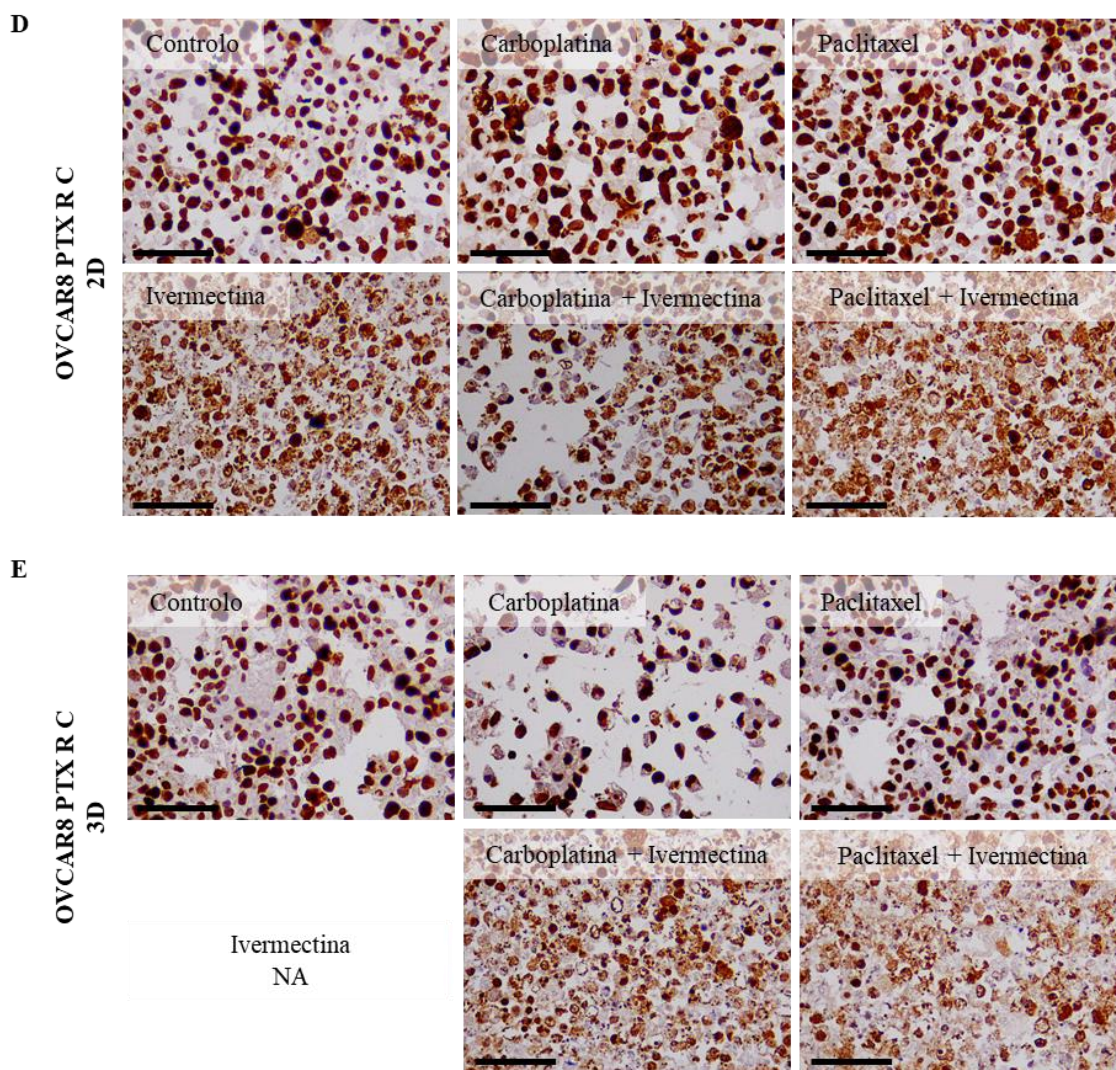
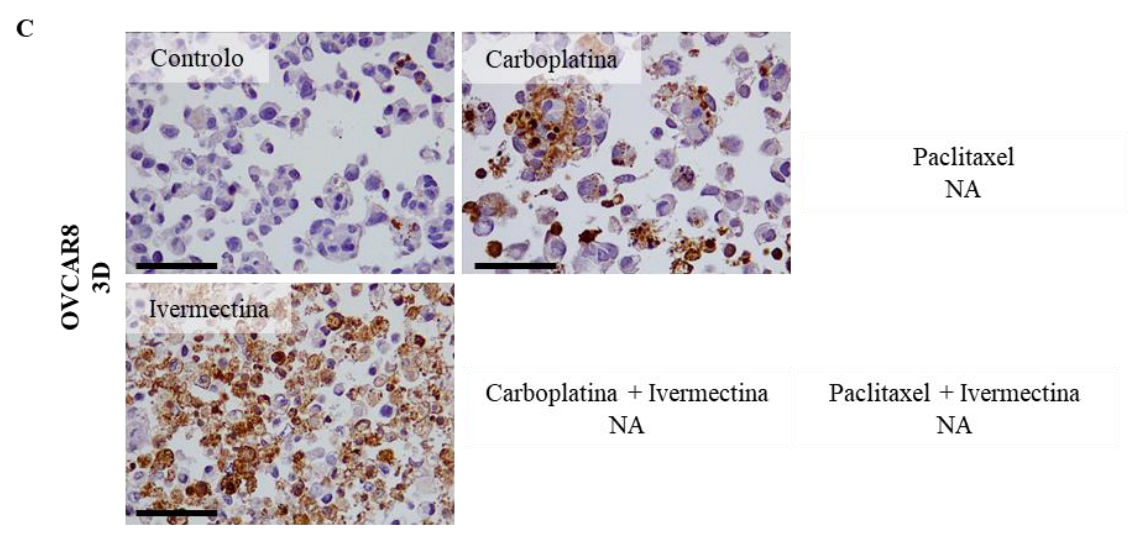
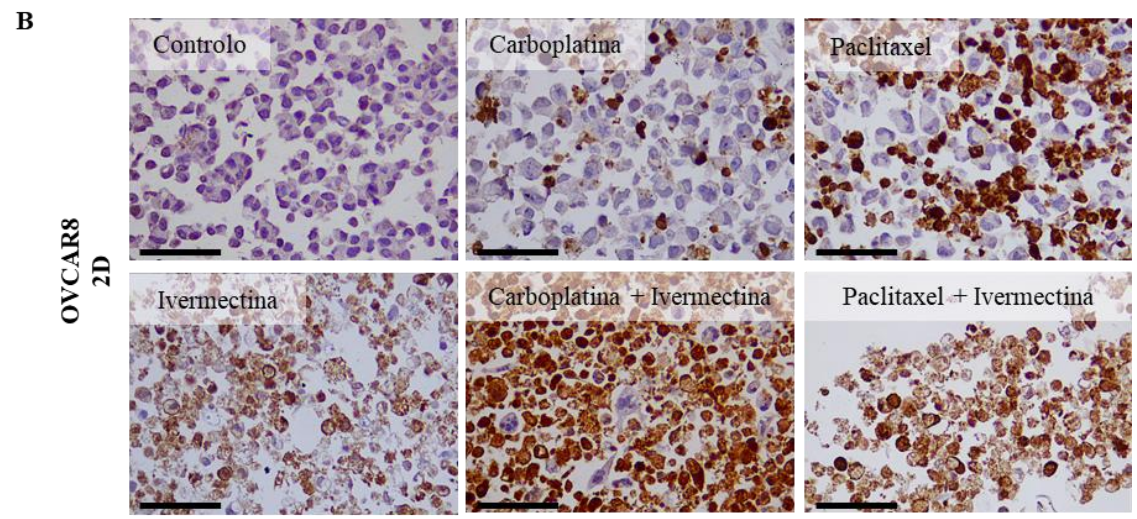
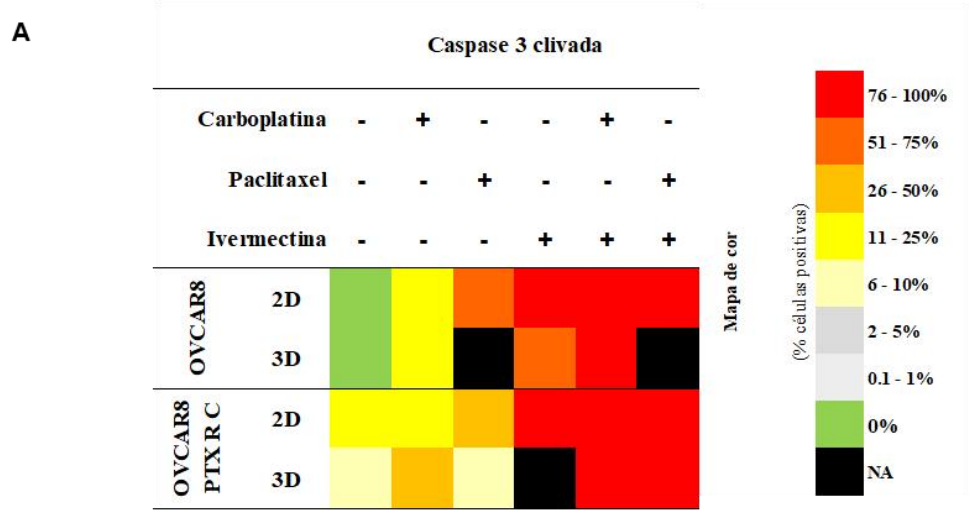


Figura 13. Expressão de Ki67 após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C. (A) Mapa de calor representando a percentagem de células marcadas e (B - E) imagens ICC representativas da expressão de Ki67 em células OVCAR8 (B e C) e OVCAR8 PTX R C (D e E) tratadas com Carboplatina ou Paclitaxel isoladamente e em combinação com Ivermectina. Todas as imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400× e a barra de escala representa 50 µm. NA, Não avaliável.

Na linha celular OVCAR8 sem tratamento, a expressão da caspase 3 clivada é inexistente (0% de células marcadas), tanto em condições 2D como 3D, sendo que, com o tratamento, é observado um aumento de expressão desta proteína. Em ambas as condições é observadas um menor nível de marcação quando as células são tratadas isoladamente com carboplatina (11-25% de células marcadas). Um aumento de expressão é observado quando as células são tratadas isoladamente com paclitaxel (51-75% de células positivas) em 2D, ou isoladamente com ivermectina (51-75% de células positivas) em 3D, enquanto no tratamento com ivermectina isoladamente em 2D observa-se uma

marcação superior (76-100% de células positivas). Nos tratamentos com combinações, paclitaxel + ivermectina e carboplatina + ivermectina, é observada uma elevada expressão de caspase 3 clivada em ambas as condições (76-100% de células positivas).

Nas células OVCAR8 PTX R C, a expressão da caspase 3 clivada nas condições não tratadas e com o tratamento com paclitaxel apresentam uma baixa marcação (6-10% de células positivas) na cultura 3D, enquanto as condições não tratadas e o tratamento com carboplatina apresentam uma maior marcação (11-25% de células positivas), na cultura 2D. No entanto, foi visível elevados níveis de expressão da caspase 3 clivada no tratamento com carboplatina na condição 3D e no tratamento com paclitaxel em 2D (26-50% de células positivas). Os tratamentos com ivermectina apresentam uma marcação ainda mais elevada quer isoladamente (76-100% de células positivas), quer em combinação com paclitaxel ou carboplatina (76-100% de células positivas) (Figura 14).



(Cont.)

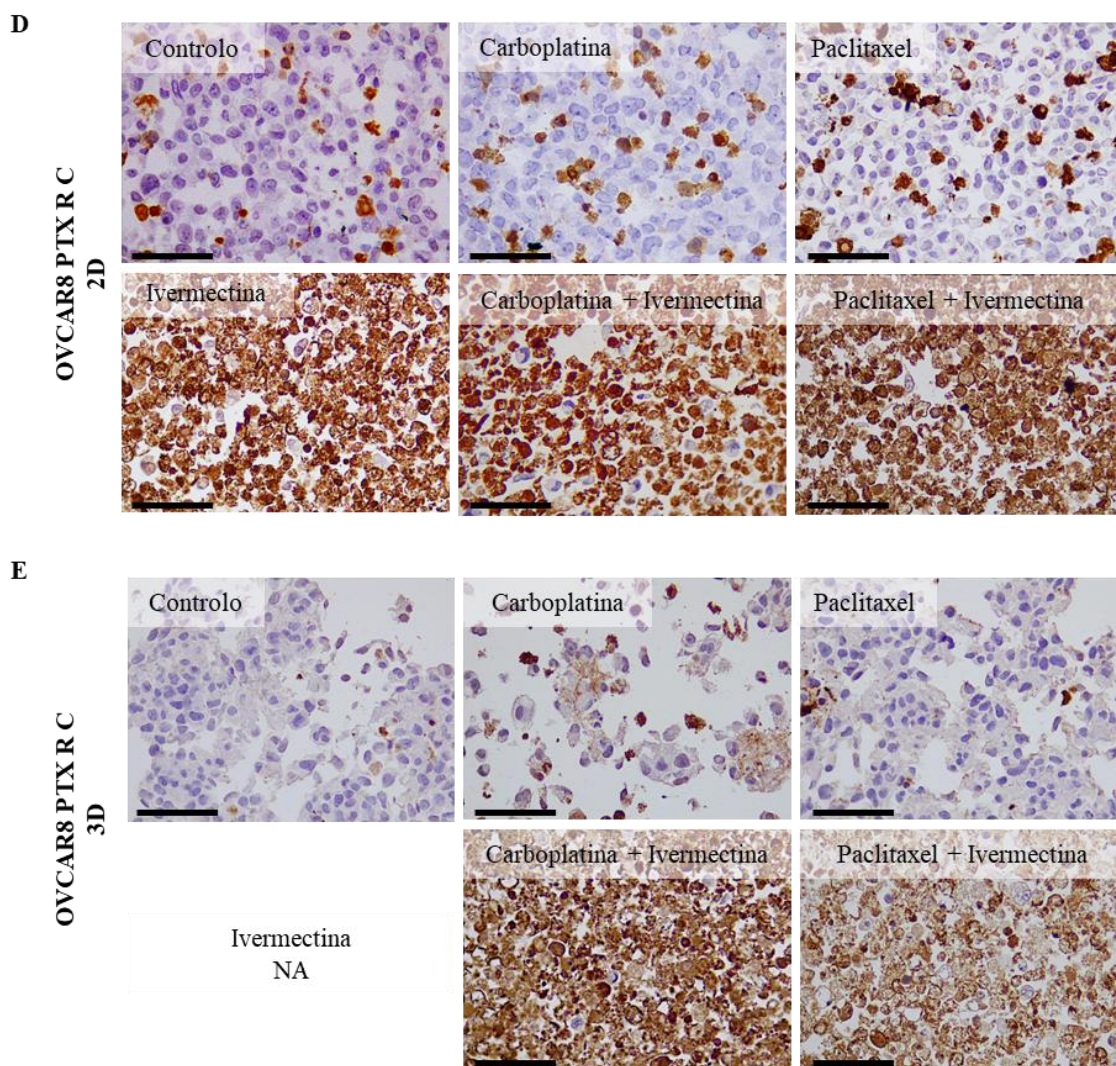
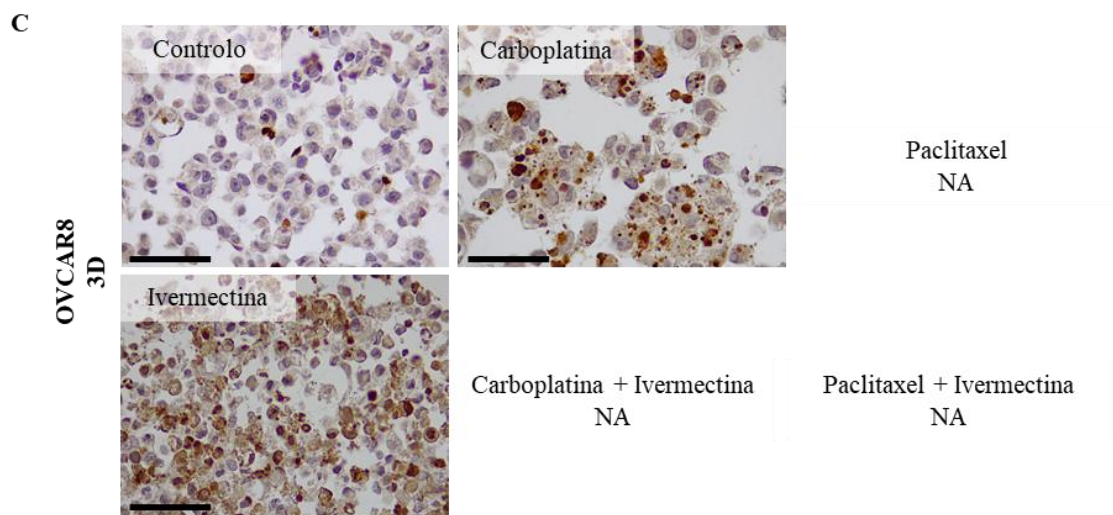
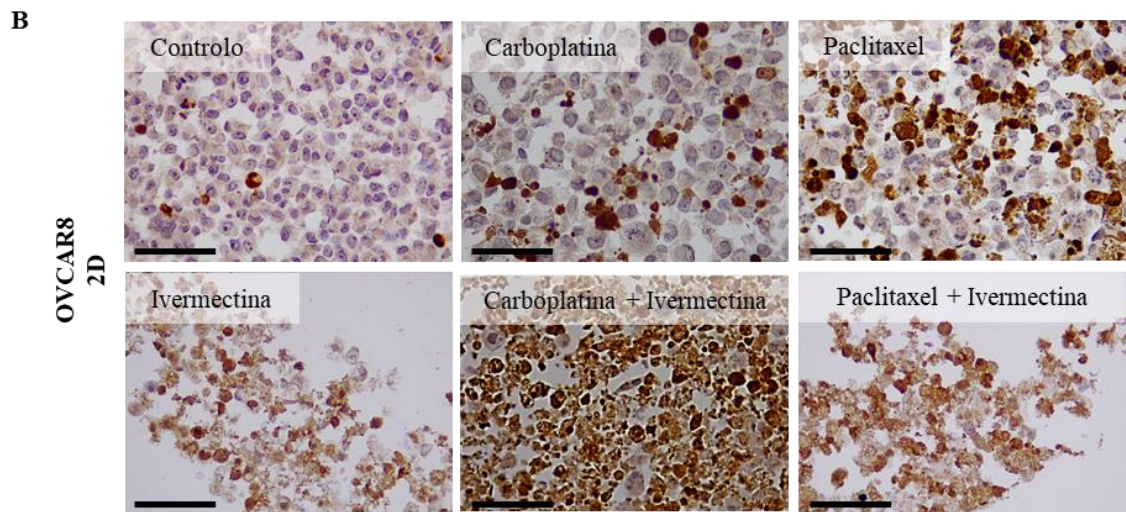
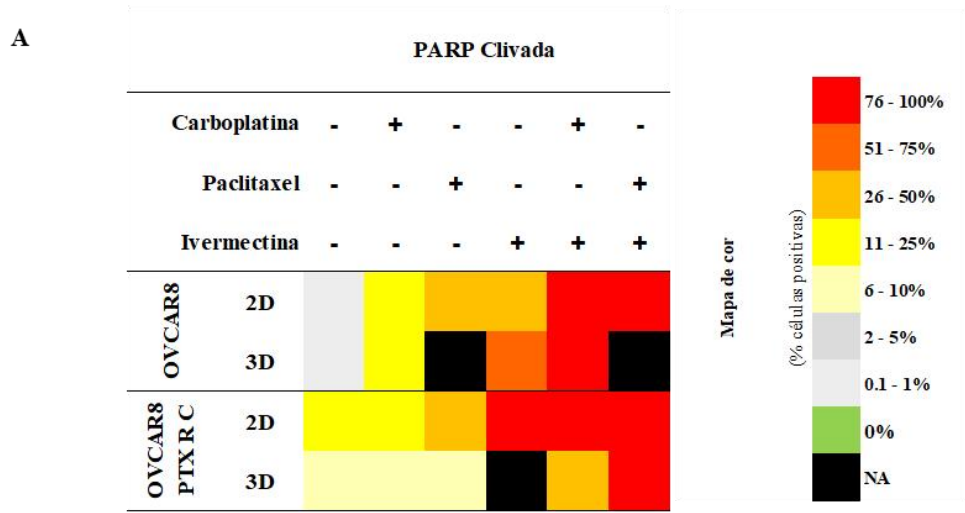


Figura 14. Expressão da caspase 3 clivada após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C. (A) Mapa de calor representando a percentagem de células marcadas e (B - E) imagens ICC representativas da expressão de caspase 3 clivada em células OVCAR8 (B e C) e OVCAR8 PTX R C (D e E) tratadas com Carboplatina ou Paclitaxel isoladamente e em combinação com Ivermectina. Todas as imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400× e a barra de escala representa 50 μm. NA, Não avaliável.

Na linha celular OVCAR8, o controlo apresenta marcação quase inexistente (0,1-1% de células positivas), em ambos os sistemas de cultura (2D e 3D), sendo que, em geral, o tratamento aumenta a expressão da PARP clivada, sugerindo um maior índice de apoptose. No tratamento com carboplatina, a marcação foi de 11-25% de células positivas. O tratamento com paclitaxel ou ivermectina isolado revelou uma marcação de 26-50% de células positivas em 2D, enquanto que em 3D o tratamento com ivermectina aumentou a marcação para 51-75%. As combinações carboplatina + ivermectina e

paclitaxel + ivermectina demonstraram uma marcação de 76-100% em ambas as condições de cultura.

Na linha celular OVCAR8 PTX R C, o controlo e o tratamento com carboplatina apresentam níveis de marcação entre 11-25%, enquanto o paclitaxel isolado marcou cerca 26-50% das células, em 2D. No tratamento isolado com ivermectina e nas combinações de fármacos (carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina, observou-se uma marcação de 76-100% de células positivas em 2D. Na cultura 3D, o controlo e os tratamentos isolados com paclitaxel ou carboplatina apresentam níveis de expressão reduzidos (6-10% de células positivas). Os tratamentos com as combinações de carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina, apresentaram uma marcação superior (26-50% e 76-100% de células positivas, respetivamente) (Figura 15).



(Cont.)

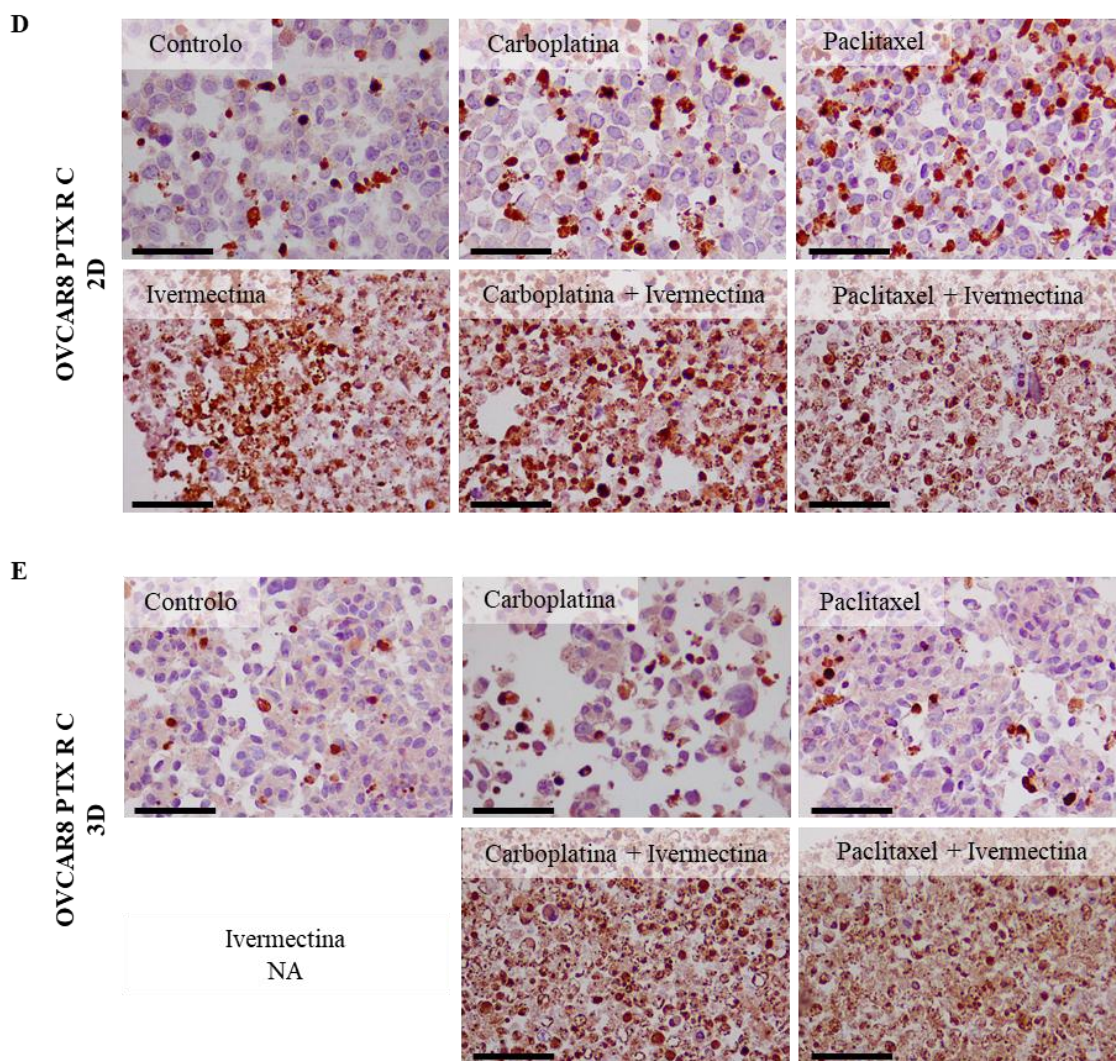


Figura 15. Expressão de PARP clivada após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel, e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C. (A) Mapa de calor representando a percentagem de células marcadas e (B - E) imagens ICC representativas da expressão de PARP clivada em células OVCAR8 (B e C) e OVCAR8 PTX R C (D e E) tratadas com Carboplatina ou Paclitaxel isoladamente e em combinação com Ivermectina. Todas as imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400× e a barra de escala representa 50 μm. NA, Não avaliável.

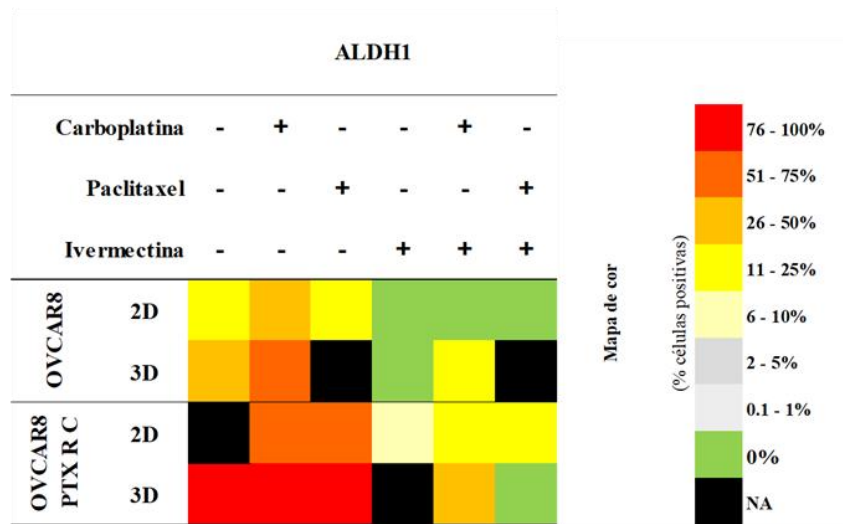
4.4. A Expressão do ALDH1 Diminuiu em Ambas as Linhas Celulares Quando Tratadas com Ivermectina

Na avaliação da ALDH1 observaram-se variados níveis de expressão com uma marcação citoplasmática em forma de “dot”. Nas OVCAR8, em 2D, as células não tratadas e as tratadas com paclitaxel apresentaram uma baixa expressão com cerca de 11-25% das células marcadas. Por outro lado, quando estas células são tratadas com ivermectina isoladamente ou em combinação (carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina) não apresentam expressão da ALDH1. No tratamento com carboplatina a

marcação é de 26-50%. Na cultura 3D, as células não tratadas apresentam marcação de 26-50%, enquanto o tratamento com carboplatina tem aumento na marcação para 51-75%. No tratamento com ivermectina observa-se um decréscimo na marcação tanto na ivermectina isolada (0% de células positivas), como no tratamento com carboplatina + ivermectina (11-25% de células positivas).

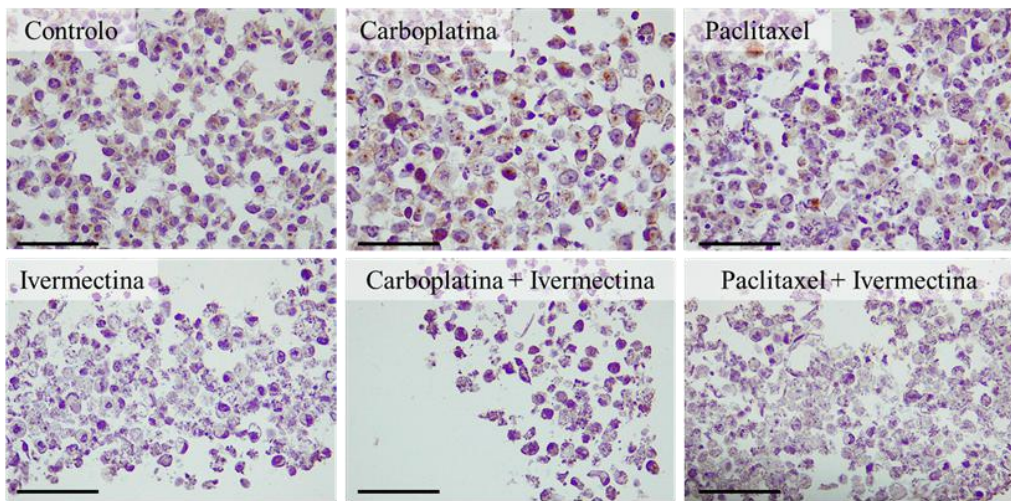
Na linha celular OVCAR8 PTX R C é apresentada uma maior expressão da ALDH1 sendo que as células não tratadas e as tratadas com carboplatina ou paclitaxel apresentam elevados níveis de expressão (76-100% de células positivas). No tratamento com carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina as células apresentam baixos níveis de marcação (26-50% e 0%, respetivamente) em 3D. Na cultura 2D, a marcação do tratamento carboplatina ou paclitaxel isolado é de 51-75%, e no tratamento combinado (carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina) diminui para 11-25% das células positivas. O nível de marcação mais baixo é no tratamento com ivermectina isolada (6-10% de células positivas) (Figura 16).

A



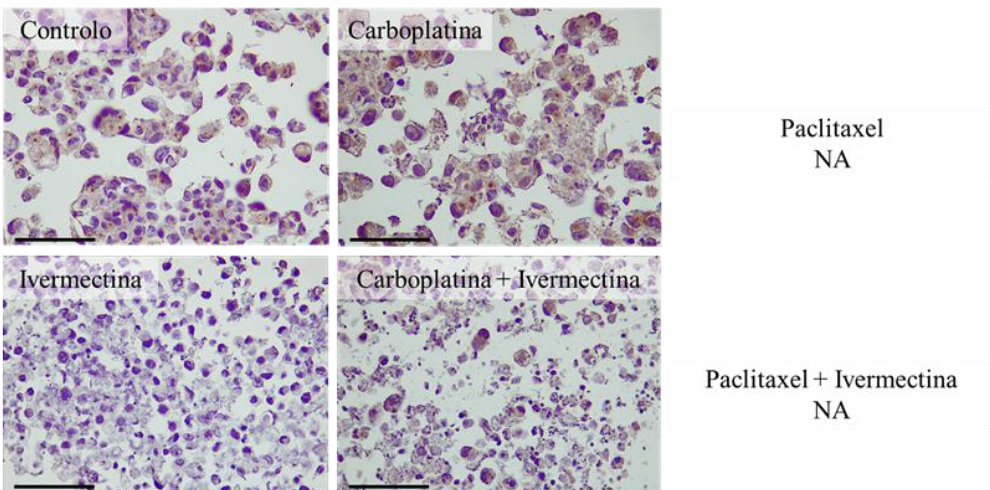
B

OVCAR8
2D



C

OVCAR8
3D



(Cont.)

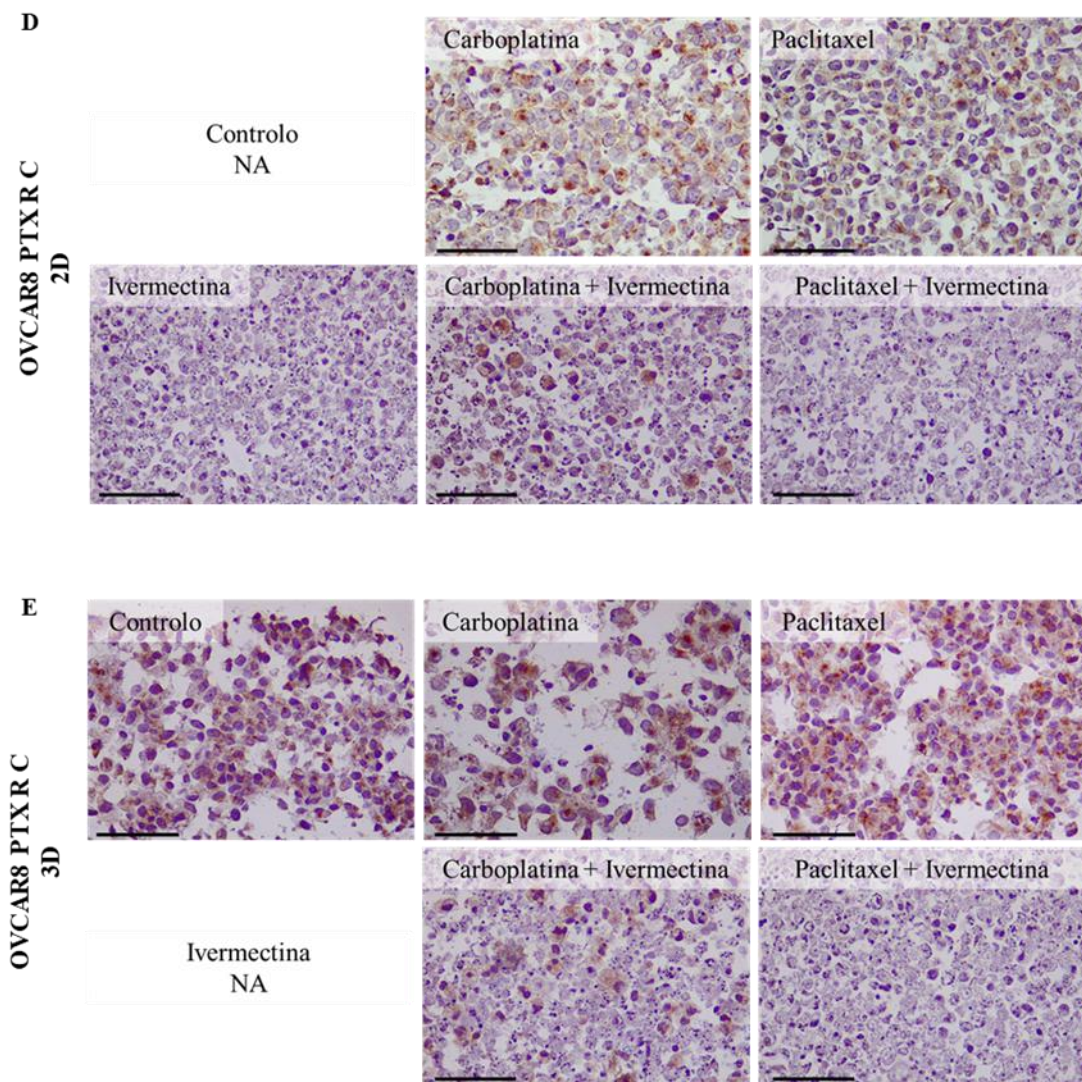


Figura 16. Expressão da ALDH1 após o tratamento com carboplatina ou paclitaxel, e em combinação com ivermectina nas linhas celulares OVCAR8 e OVCAR8 PTX R C. (A) Mapa de calor representando a percentagem de células marcadas e (B - E) imagens ICC representativas da expressão de ALDH1 em células OVCAR8 (B e C) e OVCAR8 PTX R C (D e E) tratadas com Carboplatina ou Paclitaxel isoladamente e em combinação com Ivermectina. Todas as imagens foram fotografadas com uma ampliação de 400× e a barra de escala representa 50 μm. NA, Não avaliável.

5. Discussão

O desenvolvimento deste projeto de investigação teve como objetivo avaliar, por meio da construção do CMAs, as alterações na expressão de proteínas associadas à quimiorresistência em linhas celulares de CO expostas a diferentes fármacos. O CMA permitiu obter um bloco com múltiplas condições de cultura, com *pellets* celulares fixados em formol e incluídos primeiro em histogelTM e posteriormente em parafina após processamento histológico. Assim como, originar cortes histológicos multi-amostra o que permitiu economizar reagentes na técnica de ICC. A análise dos biomarcadores MSLN, P-gp, Ki67, caspase 3 clivada, PARP clivada e ALDH1 permitiu caracterizar os efeitos citotóxicos das drogas em monoterapia e em combinação proporcionando uma alternativa às técnicas bioquímicas de análise de citotoxicidade (por exemplo, a Sulforadamina B ou Preso BlueTM) ou *western-blot* que não permitem a visualização da localização celular da proteína em estudo.

A construção de CMAs envolve várias etapas críticas que garantem a qualidade e a utilidade da ferramenta (Hutchins & Grabsch, 2018). Inicialmente, um bloco recetor é selecionado, contendo um número ideal de poços para o desenho experimental que necessitamos, sendo que nestes poços serão colocados pequenos fragmentos de *cores* cilíndricos que são extraídos de diferentes blocos de parafina dadores com o auxílio de uma agulha de biópsia (Coelho et al., 2018). O bloco recetor é criado preenchendo-se o molde de silicone selecionado com parafina líquida e colocando-se uma cassette histológica sobre o molde. Em seguida, o bloco é arrefecido sobre uma placa fria para solidificar a parafina, permitindo que o bloco recetor seja desformado (Nunes et al., 2023).

A principal vantagem do CMA é a sua capacidade de realizar estudos em larga escala, onde diferentes linhas celulares expostas a tratamentos isolados ou combinados podem ser analisadas simultaneamente reduzindo a variabilidade experimental e o consumo de reagentes. Além disso, a utilização do CMA no contexto de testes de fármacos permite a análise de alterações moleculares em células tumorais, facilitando a descoberta de novos alvos terapêuticos e a validação de biomarcadores num contexto pré-clínico (Ferrer et al., 2005; Waterworth et al., n.d.). Esta metodologia facilita não apenas a triagem de fármacos, mas também permite uma análise detalhada das alterações fenotípicas em linhas celulares tumorais antes e após a exposição a diferentes fármacos, contribuindo assim para o avanço na personalização do tratamento oncológico (Nunes et al., 2023).

A obtenção de um *pellet* celular otimizado em cultura exige a manutenção de uma densidade celular entre 1×10^6 e 5×10^7 células por condição, garantindo um rendimento adequado para a subsequente construção de CMA de alta qualidade (Nunes, et al., 2023). Esta concentração celular é fundamental para assegurar a formação de um *pellet* celular suficientemente denso, minimizando perdas experimentais. No entanto, a elevada taxa de morte celular induzida por alguns tratamentos pode comprometer a obtenção de uma quantidade satisfatória de células para análise. Neste trabalho, em algumas condições de cultura não foi possível a obtenção deste *pellet*, especificamente, para a OVCAR8 em 3D após tratamento como paclitaxel, paclitaxel + ivermectina, e OVCAR8 PTX R C em 3D após tratamento como ivermectina. Numa das situações, não foi possível obter *pellet* apesar da linha não ter sido submetida a tratamento, OVCAR8 PTX R C em 3D, e neste caso há que reconhecer que a obtenção de um *pellet* adequado para análise histológica, o que é mais difícil neste tipo de culturas 3D. No entanto, apesar dos casos NA, os resultados confirmam que a técnica de CMA foi eficaz para a identificação de padrões diferenciais de expressão proteica, permitindo a avaliação comparativa da resposta celular a várias terapias testadas.

A MSLN é uma glicoproteína, que é expressa principalmente em células mesoteliais normais, que revestem as cavidades corporais, como o tórax e o abdômen. A sua função está associada com a adesão celular e invasão tumoral (Chang, Pastan, et al., 1992; Chang & Pastan, 1996; Glass et al., 2011). A análise da MSLN revela que os tratamentos, em geral, não alteram a sua expressão normalmente elevada neste tipo de células tumorais. Apenas foram observadas ligeiras diminuições na expressão para a linha OVCAR8 PTX R C identificando provavelmente uma mudança para um fenótipo menos diferenciado (ou seja, mais estaminal e associado com a resistência a fármacos).

A P-gp é uma proteína de efluxo muito expressa em células tumorais resistentes à quimioterapia, desempenhando um papel fundamental na expulsão de fármacos citotóxicos para o meio extracelular (Ambudkar et al., 1999; Cordon-Cardo et al., 1990; Gottesman et al., 1996). A sua marcação ICC ocorre predominantemente na membrana citoplasmática, embora em alguns casos, possa ser observada uma coloração citoplasmática difusa, indicativa da sua presença em compartimentos intracelulares antes da translocação para a membrana (Calcabrini et al., 2000; Cordon-Cardo et al., 1990). A marcação intensa na membrana celular está associada a fenótipos tumorais mais agressivos, indicando um elevado potencial metastático e resistência ao tratamento (Calcabrini et al., 2000; Cordon-Cardo et al., 1990). Os resultados indicam que a

expressão da P-gp é significativamente maior nas células OVCAR8 PTX R C tratadas com paclitaxel isoladamente, sugerindo que a resistência ao fármaco é mediada pelo efluxo ativo promovido por esta proteína. A correlação entre a elevada marcação da P-gp e a redução da eficácia terapêutica reforça a hipótese de que a sua sobre-expressão está diretamente ligada com a quimiorresistência no CO. Assim, a identificação de P-gp como um biomarcador relevante aponta para a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas, incluindo inibidores de P-gp, para restaurar a eficácia dos tratamentos convencionais.

O Ki67 é um marcador de proliferação celular expresso exclusivamente em células que estão ativamente em divisão (Gerdes et al., 1983). A sua expressão ocorre predominantemente no núcleo das células proliferativas e está ausente em células quiescentes (fase G0 do ciclo celular) (Arch& et al., 1988; Tazzari et al., 1990; Xia et al., 2021). A intensidade da marcação varia conforme a taxa proliferativa do tecido analisado. A marcação intensa é frequentemente associada a tumores mais agressivos e com elevado potencial metastático (Schlfilter et al., n.d.). A elevada marcação de Ki67 na maioria das amostras sugere que a proliferação celular se mantém ativa, mesmo após o tratamento, indicando limitações na eficácia dos agentes utilizados. Comparativamente, as células OVCAR8 PTX R C exibiram um maior índice proliferativo em relação às OVCAR8, reforçando a hipótese de quimiorresistência. Assim, com estes resultados destaca-se a necessidade de estratégias terapêuticas que reduzam a proliferação tumoral, como inibidores do ciclo celular e terapias combinadas que aumentem a eficácia dos agentes convencionais (Nunes et al., 2021).

A análise da apoptose, por meio da caspase 3 clivada e da PARP clivada, demonstrou que as combinações de carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina apresentaram os melhores resultados na indução de morte celular, particularmente nas células duplamente resistentes (OVCAR8 PTX R C). Esse resultado é consistente com a hipótese de que abordagens combinadas podem ser mais eficazes na superação da quimiorresistência. Neste contexto, estudos recentes têm reforçado o potencial terapêutico da ivermectina como agente adjuvante na terapêutica oncológica (Laing et al., 2017; N. Li & Zhan, 2020). Por exemplo, foi demonstrado que a ivermectina possui uma capacidade relevante de inibir a progressão tumoral, tanto linhas celulares de CO humano *in vitro* quanto em modelos de xenoenxerto de ratinhos (Hirokawa et al., 2006). Além disso, observou-se que este fármaco apresenta uma toxicidade seletiva, afetando preferencialmente células tumorais e preservando células normais (K. Wang et al., 2016).

Um dos aspectos mais relevantes é a sua atuação sinérgica com outros agentes antitumorais, como antiestrogénios, promovendo um efeito antiproliferativo mais acentuado, especialmente em contextos de resistência aos derivados de platina (N. Li & Zhan, 2020; Lokich et al., 2014). Esses dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo, indicando que a associação de ivermectina com quimioterápicos convencionais, como a carboplatina, pode intensificar a resposta antitumoral e representar uma abordagem eficaz para o tratamento de neoplasias do CO. A caspase 3 clivada é uma protease executora da apoptose, sendo ativada nas fases finais da morte celular programada (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2018; Riedl & Shi, 2004; Rybczynska et al., 2018). A sua marcação ICC ocorre predominantemente no citoplasma das células apoptóticas, podendo também ser observada no núcleo para alguns casos. A intensidade da marcação varia de acordo com o grau de apoptose presente na amostra, sendo geralmente difusa e granular. A marcação intensa está frequentemente associada a uma ativação robusta da apoptose (Beroske et al., 2021; Limpachayaporn et al., 2015). A elevada marcação de caspase 3 clivada indica que o tratamento foi eficaz em induzir apoptose e reduzir a viabilidade tumoral. Em contrapartida, níveis reduzidos sugerem resistência celular, reforçando a necessidade de abordagens terapêuticas que reativem as vias apoptóticas, como moduladores de apoptose ou terapias combinadas para aumentar a sensibilidade tumoral aos agentes quimioterápicos.

A PARP clivada é um marcador essencial da apoptose, sendo ativada em resposta a danos no DNA (Nagata & Tanaka, 2017). A sua marcação ICC ocorre predominantemente no núcleo das células apoptóticas, uma vez que a clivagem da PARP é um evento característico da fase final do processo apoptótico. A ausência de marcação indica células viáveis e/ou resistentes à apoptose, sendo que uma marcação intensa nas células sugere uma resposta eficaz ao tratamento citotóxico. A análise da apoptose, por meio da caspase 3 clivada e da PARP clivada, demonstrou que as combinações de carboplatina + ivermectina e paclitaxel + ivermectina apresentaram os melhores resultados na indução de morte celular programada, particularmente nas células duplamente resistentes (OVCAR8 PTX R C). Este resultado é consistente com a hipótese de que abordagens combinadas podem ser mais eficazes na superação da quimiorresistência e é concordante com os resultados obtidos com a marcação do Ki67.

A ALDH1 é uma enzima de desintoxicação celular responsável pela oxidação do aldeído intracelular, e a sua marcação ocorre predominantemente no citoplasma (Sophos & Vasiliou, n.d; Y. C. Wang et al., 2012). A análise da expressão da ALDH1 nos CMAs

revelou elevados níveis de marcação na OVCAR8 PTX R C em condições 3D. Esta elevada expressão foi observada nas células sem tratamento e com tratamento em monoterapia. Esta tendência também se verificou nestas células em condições 2D, mas de uma forma menos acentuada. Elevados níveis da enzima ALDH1 estão associados com a metabolização de drogas no citoplasma das células levando à resistência a fármacos. Como a linha OVCAR8 PTX R C é resistente à carboplatina e ao paclitaxel seria de esperar elevados níveis deste biomarcador pela natureza desta linha. Em condições 3D, onde a organização celular é mais complexa, parece haver uma tendência para uma maior resistência mimetizando melhor a biologia do CO nas pacientes.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho validam a utilização de CMA na caracterização molecular de linhas de CO e sugerem que as terapias combinadas podem representar uma alternativa promissora para reverter a quimiorresistência. A aplicabilidade do CMA na avaliação de alterações na expressão de proteínas induzidas por fármacos é um avanço significativo no contexto da análise da biologia e da bioquímica dos tumores. Esta metodologia permite de um modo mais rápido e com um contexto morfológico detalhado entender os mecanismos de resistência associados a diversos compostos uma vez que permite a análise de múltiplas condições em simultâneo.

Para além disso, apesar dos resultados promissores obtidos neste trabalho, é importante reconhecer algumas limitações que influenciam a interpretação e a generalização dos dados. A utilização de apenas duas linhas celulares, embora relevante para modelar fenótipos distintos de quimiorresistência, não permite extrapolar conclusões para todos os subtipos de CO. Além disso, embora os ensaios de ICC tenham permitido uma caracterização detalhada da expressão de biomarcadores como a MSLN, P-gp, Ki67, Caspase 3 clivada, PARP clivada e ALDH1, a análise permaneceu essencialmente descritiva. Estudos complementares que envolvam quantificação por métodos adicionais, como PCR ou *Western blot*, poderiam reforçar e validar as observações feitas.

As perspetivas futuras deste estudo são amplas e apontam para diversas linhas de investigação. Uma primeira etapa importante será a validação dos resultados em modelos *in vivo*, que permitam avaliar o efeito das combinações terapêuticas num contexto fisiológico mais próximo da realidade clínica. A aplicação de xenotransplantes em ratinhos poderá contribuir para avaliar a eficácia antitumoral da ivermectina em combinação com quimioterápicos, bem como o seu perfil de toxicidade. Além disso, a utilização de tecnologias de alto rendimento, como a transcriptómica e a proteómica, poderá identificar vias moleculares adicionais moduladas pelos tratamentos combinados, abrindo caminho ao desenvolvimento de terapias direcionadas mais eficazes.

A realização deste estágio representou uma etapa fundamental no meu percurso académico e profissional, permitindo-me aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo da formação e desenvolver competências práticas num ambiente real de trabalho. Ao longo deste período, enfrentei desafios que contribuíram para o meu crescimento pessoal e técnico, aprendi com profissionais experientes e tive a oportunidade de aprofundar o meu entendimento sobre o funcionamento da área onde atuei.

Este estágio reforçou o meu interesse pela área e confirmou a vontade de continuar a investir no meu desenvolvimento neste caminho. Saio desta experiência com uma visão mais clara sobre as exigências do mercado de trabalho, mais confiante nas minhas capacidades e grata pela oportunidade de aprendizagem.

7. Referências Bibliográficas

- Abbasi, M. M., Valizadeh, H., Hamishekar, H., Mohammadnejad, L., & Zakeri-Milani, P. (2016). The effects of cetirizine on P-glycoprotein expression and function in vitro and in situ. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(1), 111–118. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.017>
- Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2003). Ovarian cancer: Strategies for overcoming resistance to chemotherapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Issue 7, pp. 502–516). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nrc1123>
- Ambudkar, S. V, Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1999). BIOCHEMICAL, CELLULAR, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF THE MULTIDRUG TRANSPORTER 1. In *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* (Vol. 39). www.annualreviews.org
- Amé, J.-C., Ronique Rolli, V., Rie Schreiber, V., Niedergang, C., Oise Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Höger, T., Ménessier-de Murcia, J., & de Murcia, G. (1999). *PARP-2, A Novel Mammalian DNA Damage-dependent Poly(ADP-ribose) Polymerase**. <http://www.jbc.org/>
- Andersson, A. C., Strömberg, S., Bäckvall, H., Kampf, C., Uhlen, M., Wester, K., & Pontén, F. (2006). Analysis of protein expression in cell microarrays: A tool for antibody-based proteomics. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(12), 1413–1423. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A7001.2006>
- Andressakis, D., Lazaris, A. C., Tsiambas, E., Kavantzias, N., Rapidis, A., & Patsouris, E. (2008). Evaluation of caspase-3 and caspase-8 deregulation in tongue squamous cell carcinoma, based on immunohistochemistry and computerised image analysis. *Journal of Laryngology and Otology*, 122(11), 1213–1218. <https://doi.org/10.1017/S0022215108002636>
- Arch&, V., Braun, N., Papadopoulos, T., & Miiller-Hermelink, H. K. (1988). Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. In *Virchows Archiv B Cell Pathol* (Vol. 56).
- Bae, T., Weon, K.-Y., Lee, J.-W., Eum, K.-H., Kim, S., & Woo Choi, J. (2015). *Restoration of paclitaxel resistance by CDK1 intervention in drug resistant ovarian*

cancer Running title: *Reversal of paclitaxel resistance by inhibition of CDK1*
Downloaded from (Vol. 12). <http://carcin.oxfordjournals.org/>

- Baldwin, L. A., Huang, B., Miller, R. W., Tucker, T., Goodrich, S. T., Podzielinski, I., Desimone, C. P., Ueland, F. R., Van Nagell, J. R., & Seamon, L. G. (2012). Ten-year relative survival for epithelial ovarian cancer. *Obstetrics and Gynecology*, *120*(3), 612–618. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318264f794>
- Benjamin, R. C., & Gill, D. M. (1980a). ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly(ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(21), 10493–10501. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)70490-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)70490-6)
- Bera, T. K., & Pastan, I. (2000). *Mesothelin Is Not Required for Normal Mouse Development or Reproduction* (Vol. 20, Issue 8). <http://mcb.asm.org/>
- Berek, J. S., Friedlander, M. L., & Bast, R. C. (2017a). Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancer. In *Holland-Frei Cancer Medicine* (pp. 1–27). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119000822.hfcm105>
- Beroske, L., Van den Wyngaert, T., Stroobants, S., Van der Veken, P., & Elvas, F. (2021a). Molecular imaging of apoptosis: The case of caspase-3 radiotracers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22083948>
- Bois, A. du, Kristensen, G., Ray-Coquard, I., Reuss, A., Pignata, S., Colombo, N., Denison, U., Vergote, I., del Campo, J. M., Ottevanger, P., Heubner, M., Minarik, T., Sevin, E., de Gregorio, N., Bidziński, M., Pfisterer, J., Malander, S., Hilpert, F., Mirza, M. R., ... Harter, P. (2016). Standard first-line chemotherapy with or without nintedanib for advanced ovarian cancer (AGO-OVAR 12): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *17*(1), 78–89. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00366-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00366-6)
- Bois, A. Du, Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., & Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the arbeitsgemeinschaft gynaekologische onkologie studien-gruppe ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the groupe d'Investigateurs

- nationaux pour les études des cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115(6), 1234–1244. <https://doi.org/10.1002/cncr.24149>
- Bookman, M. A., Brady, M. F., McGuire, W. P., Harper, P. G., Alberts, D. S., Friedlander, M., Colombo, N., Fowler, J. M., Argenta, P. A., De Geest, K., Mutch, D. G., Burger, R. A., Swart, A. M., Trimble, E. L., Accario-Winslow, C., & Roth, L. M. (2009). Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: A phase III trial of the gynecologic cancer intergroup. *Journal of Clinical Oncology*, 27(9), 1419–1425. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.1684>
- Boussios, S., Zarkavelis, G., Seraj, E., Zerdes, I., Tatsi, K., & Pentheroudakis, G. (2016). Non-epithelial ovarian cancer: Elucidating uncommon gynaecological malignancies. In *Anticancer Research* (Vol. 36, Issue 10, pp. 5031–5042). International Institute of Anticancer Research. <https://doi.org/10.21873/anticanres.11072>
- Brown, D. C., & Gatter, K. C. (n.d.). *Ki67 protein: the immaculate deception?*
- Burger, R. A., Brady, M. F., Bookman, M. A., Fleming, G. F., Monk, B. J., Huang, H., Mannel, R. S., Homesley, H. D., Fowler, J., Greer, B. E., Boente, M., Birrer, M. J., & Liang, S. X. (n.d.). *Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer Abstract*.
- Calcabrini, A., Meschini, S., Stringaro, A., Cianfriglia, M., Arancia, G., & Molinari, A. (2000). Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells. In *The Histochemical Journal* (Vol. 32).
- Caspases 9 and 3 in adenoid cystic carcinoma*. (n.d.).
- Chang, K., Batra, J. K., & Pastan, I. (1992). *Characterization of the Antigen (CAK1) Recognized by Monoclonal Antibody Ki Present on Ovarian Cancers and Normal Mesothelium*. <https://www.researchgate.net/publication/21429163>
- Chang, K., & Pastan, I. (1996). Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers (glycosylphosphatidylinositol anchor/plasma membrane/antibody/cell adhesion). In *Cell Biology* (Vol. 93).

- Chang, K., Pastan, I., & Willingham, M. C. (1992). *ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MONOCLONAL ANTIBODY, KI, REACTIVE WITH OVARIAN CANCERS AND NORMAL MESOTHELIUM* (Vol. 50).
- Chiaffarino, F., Pelucchi, C., Parazzini, F., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Conti, E., Montella, M., & ^avecchia, & C. (2001). Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. In *Annals of Oncology* (Vol. 12). <https://academic.oup.com/annonc/article-abstract/12/3/337/168066>
- Cho, K. R., & Shih, I. M. (2009). Ovarian cancer. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 4, pp. 287–313). <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>
- Choi, C. H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. In *Cancer Cell International* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-30>
- Choi, Y. H., & Yu, A.-M. (2014). ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development HHS Public Access. In *Curr Pharm Des* (Vol. 20, Issue 5).
- Chute, J. P., Muramoto, G. G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N. J., & Mcdonnell, D. P. (2006). Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. In *PNAS August 1* (Vol. 103). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603806103
- Ciancio, N., Grazia Galasso, M., Campisi, R., Bivona, L., Migliore, M., & Di Maria, G. U. (2012). *Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer*. <http://www.mrmjournal.com/content/7/1/29>
- Cibula, D., Gompel, A., Mueck, A. O., La Vecchia, C., Hannaford, P. C., Skouby, S. O., Zikan, M., & Dusek, L. (2010). Hormonal contraception and risk of cancer. *Human Reproduction Update*, 16(6), 631–650. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq022>
- Clay, M. R., Tabor, M., Owen, J. H., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wolf, G. T., Wicha, M. S., & Prince, M. E. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head and Neck*, 32(9), 1195–1201. <https://doi.org/10.1002/hed.21315>

- Clevenger, L., Schrepf, A., Degeest, K., Bender, D., Goodheart, M., Ahmed, A., Dahmouh, L., Penedo, F., Lucci, J., Thaker, P. H., Mendez, L., Sood, A. K., Slavich, G. M., & Lutgendorf, S. K. (2013). Sleep disturbance, distress, and quality of life in ovarian cancer patients during the first year after diagnosis. *Cancer*, *119*(17), 3234–3241. <https://doi.org/10.1002/cncr.28188>
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G (2008). Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87303 controls. *Lancet* *371*:303–314.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Gaitskell K, Hermon C, Moser K, Reeves G, et al. (2015). Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet* *385*:1835–1842.
- Colombo, N., Peiretti, M., Garbi, A., Carinelli, S., Marini, C., & Sessa, C. (2012). Non-epithelial ovarian cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *23*(SUPPL. 7). <https://doi.org/10.1093/annonc/mds223>
- Colombo, N., Sessa, C., Du Bois, A., Ledermann, J., McCluggage, W. G., McNeish, I., Morice, P., Pignata, S., Ray-Coquard, I., Vergote, I., Baert, T., Belaroussi, I., Dashora, A., Olbrecht, S., Planchamp, F., & Querleu, D. (2019). ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: Pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Annals of Oncology*, *30*(5), 672–705. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz062>
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., & Melamed, M. R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-Glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *38*(9), 1277–1287. <https://doi.org/10.1177/38.9.1974900>
- Crum, C. P., Drapkin, R., Miron, A., Ince, T. A., Muto, M., Kindelberger, D. W., & Lee, Y. (n.d.). *The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis*.
- D'Angelo, E., & Prat, J. (2010). Uterine sarcomas: A review. In *Gynecologic Oncology* (Vol. 116, Issue 1, pp. 131–139). <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.023>

- Das, T., Anand, U., Pandey, S. K., Ashby, C. R., Assaraf, Y. G., Chen, Z. S., & Dey, A. (2021). Therapeutic strategies to overcome taxane resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100754>
- Dewdney, S. B., Rimel, B. J., Reinhart, A. J., Kizer, N. T., Brooks, R. A., Massad, L. S., & Zigelboim, I. (2010). The role of neoadjuvant chemotherapy in the management of patients with advanced stage ovarian cancer: Survey results from members of the Society of Gynecologic Oncologists. *Gynecologic Oncology*, 119(1), 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.06.021>
- Di Cristofano, A., & Ellenson, L. H. (2007). Endometrial carcinoma. In *Annual Review of Pathology* (Vol. 2, pp. 57–85). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091905>
- Donnez, J., Casanas-Roux, oise, Jacques Caprasse, B., Ferin, J., & Thomas, K. (1985). *Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life* (Vol. 43, Issue 4).
- Douville, J., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 18(1), 17–26. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0055>
- Du Bois, A., Marth, C., Pfisterer, J., Harter, P., Hilpert, F., Zeimet, A. G., & Sehouli, J. (2012). Neoadjuvant chemotherapy cannot be regarded as adequate routine therapy strategy of advanced ovarian cancer. In *International Journal of Gynecological Cancer* (Vol. 22, Issue 2, pp. 182–185). <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31821d419a>
- El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H., & Caldecott, K. W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5526–5533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg761>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In *Toxicologic Pathology* (Vol. 35, Issue 4, pp. 495–516). <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

- Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 221, Issue 6). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in Molecular Biology*, *1180*, 31–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3
- Feng, F. Y., de Bono, J. S., Rubin, M. A., & Knudsen, K. E. (2015). Chromatin to Clinic: The Molecular Rationale for PARP1 Inhibitor Function. In *Molecular Cell* (Vol. 58, Issue 6, pp. 925–934). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.016>
- Ferlay, J., Parkin, D. M., & Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, *46*(4), 765–781. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.12.014>
- Ferrer, B., Bermudo, R., Thomson, T., Nayach, I., Soler, M., Sánchez, M., Castillo, M., Calvo, J., Campo, E., & Fernández, P. L. (2005). Paraffin-embedded cell line microarray (PECLIMA): Development and validation of a high-throughput method for antigen profiling of cell lines. *Pathobiology*, *72*(5), 225–232. <https://doi.org/10.1159/000089416>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, *3*(5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Fisher, A. E. O., Hohegger, H., Takeda, S., & Caldecott, K. W. (2007). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(15), 5597–5605. <https://doi.org/10.1128/mcb.02248-06>
- Ford, C. E., Werner, B., Hacker, N. F., & Warton, K. (2020). The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. In *British Journal of Cancer* (Vol. 123, Issue 1, pp. 9–16). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0875-x>
- Gaitskell, K., Green, J., Pirie, K., Barnes, I., Hermon, C., Reeves, G. K., & Beral, V. (2018). Histological subtypes of ovarian cancer associated with parity and

- breastfeeding in the prospective Million Women Study. *International Journal of Cancer*, 142(2), 281–289. <https://doi.org/10.1002/ijc.31063>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 3, pp. 486–541). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gayther, S. A., & Pharoah, P. D. P. (2010). The inherited genetics of ovarian and endometrial cancer. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 20, Issue 3, pp. 231–238). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.03.001>
- Gentile, V., Vicini, P., Giacomelli, L., Cardillo, M. R., & Pierangelini, A. M. D. (2006). DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS DNA, P53 AND K167 EXPRESSION IN PENILE CARCINOMAS. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY* (Vol. 19, Issue 1).
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). *PRODUCTION OF A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY REACTIVE WITH A HUMAN NUCLEAR ANTIGEN ASSOCIATED WITH CELL PROLIFERATION and Institute of Biochem.*
- Gerlach, C., Sakkab, D. Y., Scholzen, T., Daßler, R., Alison, M. R., & Gerdes, J. (1997). *Ki-67 Expression During Rat Liver Regeneration After Partial Hepatectomy.*
- Geyer, F. C., Rodrigues, D. N., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2012). *Molecular Classification of Estrogen Receptor-positive/ Luminal Breast Cancers.* www.anatomicpathology.com
- Gilks, C. B., & Prat, J. (2009). Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Human Pathology*, 40(9), 1213–1223. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.04.017>
- Giltane, J. M., & Rimm, D. L. (2004). Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. In *Nature Clinical Practice Oncology* (Vol. 1, Issue 2, pp. 104–111). <https://doi.org/10.1038/ncponc0046>

- Glass, J. P., Parasher, G., Arias-Pulido, H., Donohue, R., Cerilli, L. A., & Prossnitz, E. R. (2011). Mesothelin and GPR30 staining among a spectrum of pancreatic epithelial neoplasms. *International Journal of Surgical Pathology*, *19*(5), 588–596. <https://doi.org/10.1177/1066896911409575>
- Goff, B. A., Mandel, L. S., Melancon, C. H., & Muntz, H. G. (n.d.). *Frequency of Symptoms of Ovarian Cancer in Women Presenting to Primary Care Clinics*. <http://jama.jamanetwork.com/>
- González-Martín, A., Sánchez-Lorenzo, L., Bratos, R., Márquez, R., & Chiva, L. (2014). First-line and maintenance therapy for ovarian cancer: Current status and future directions. In *Drugs* (Vol. 74, Issue 8, pp. 879–889). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0221-9>
- Gottesman, M. M., Pastant, I., & Ambudkar, S. V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. In *Current Opinion in Genetics & Development* (Vol. 6).
- Griffiths, C. T., & Fuller, A. F. (1978). Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surgical Clinics of North America*, *58*(1), 131–142. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(16\)41440-4](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(16)41440-4)
- Hacker, N. F., & Rao, A. (2017). Surgery for advanced epithelial ovarian cancer. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 41, pp. 71–87). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.007>
- Hague, A., Eveson, J. W., MacFarlane, M., Huntley, S., Janghra, N., & Thavaraj, S. (2004). Caspase-3 expression is reduced, in the absence of cleavage, in terminally differentiated normal oral epithelium but is increased in oral squamous cell carcinomas and correlates with tumour stage. *Journal of Pathology*, *204*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1002/path.1630>
- Hellsten, R., Johansson, M., Dahlman, A., Sterner, O., & Bjartell, A. (2011). Galiellalactone inhibits stem cell-like ALDH-positive prostate cancer cells. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022118>
- Hennessy, B. T., Coleman, R. L., & Markman, M. (2009). Ovarian cancer Epidemiology and risk factors. *The Lancet*, *374*, 1371–1382. <https://doi.org/10.1016/S0140>

- Hess, L. M., Benham-Hutchins, M., Herzog, T. J., Hsu, C. H., Malone, D. C., Skrepnek, G. H., Slack, M. K., & Alberts, D. S. (2007). A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, *17*(3), 561–570. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00846.x>
- Holdsworth-Carson, S. J., Menkhorst, E., Maybin, J. A., King, A., & Girling, J. E. (2023). Cyclic processes in the uterine tubes, endometrium, myometrium, and cervix: pathways and perturbations. In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 29, Issue 5). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaad012>
- Hooghe, B., Hulpiau, P., van Roy, F., & De Bleser, P. (2008). ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn195>
- Huang, J.-S., Yang, C.-M., Wang, J.-S., Liou, H.-H., Hsieh, I.-C., Li, G.-C., Huang, S.-J., Shu, C.-W., Fu, T.-Y., Lin, Y.-C., Ger, L.-P., & Liu, P.-F. (n.d.). *Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma*. www.impactjournals.com/oncotarget
- Huang, K. C., Yang, J., Ng, M. C., Ng, S. K., Welch, W. R., Muto, M. G., Berkowitz, R. S., & Ng, S. W. (2016). Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *European Journal of Cancer*, *67*, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.08.007>
- Illiam, W., Uire, G., Oskins, I. J. H., Ark, M., Rady, F. B., Ucera, A. R. K., Dward, E., Artridge, E. P., Atherine, K., Ook, Y. L., Larke -P Earson, A. L. C., Artin, M., & Avidson, D. (1996). CYCLOPHOSPHAMIDE AND CISPLATIN COMPARED WITH PACLITAXEL AND CISPLATIN IN PATIENTS WITH STAGE III AND STAGE IV OVARIAN CANCER A STANDARD therapy for women with advanced. In *Number* (Vol. 334). Massachusetts Medical Society.
- Ishihara, M., Mukai, H., Nagai, S., Onozawa, M., Nihei, K., Shimada, T., & Wada, N. (2013). Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast cancer: Effects of biologic subtype and ki67 overexpression on

- survival. *Oncology (Switzerland)*, 84(3), 135–140.
<https://doi.org/10.1159/000345321>
- Iwata, H. (2011). Neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal patients with hormone receptor-positive early breast cancer: A new concept. *Breast Cancer*, 18(2), 92–97. <https://doi.org/10.1007/s12282-010-0233-6>
- Iyer, V. R., & Lee, S. I. (2010). MRI, CT, and PET/CT for ovarian cancer detection and adnexal lesion characterization. In *American Journal of Roentgenology* (Vol. 194, Issue 2, pp. 311–321). <https://doi.org/10.2214/AJR.09.3522>
- j.1750-3639.2002.tb00426.x*. (n.d.).
- Jacob, J. H., Gershenson, D. M., Morris, M., Copeland, L. J., Burke, T. W., & Wharton, J. T. (1991). Neoadjuvant Chemotherapy and Interval Debulking for Advanced Epithelial Ovarian Cancer. In *GYNECOLOGIC ONCOLOGY* (Vol. 42).
- Jensen, T., Cessna, M., Miller, D., & Hansen, J. (2014). Tissue microarray advanced techniques for sampling donor blocks with limited tissues - introduction to “the radical-TMA.” *Journal of Histotechnology*, 37(1), 9–13.
<https://doi.org/10.1179/2046023613Y.0000000035>
- Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., Yang, C., & Chen, Y. (2021). The role of m6A modification in the biological functions and diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>
- Jordan, S. J., Whiteman, D. C., Purdie, D. M., Green, A. C., & Webb, P. M. (2006). Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. In *Gynecologic Oncology* (Vol. 103, Issue 3, pp. 1122–1129).
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.08.012>
- Josefsson, A., Wikström, P., Egevad, L., Granfors, T., Karlberg, L., Stattin, P., & Bergh, A. (2012). Low endoglin vascular density and Ki67 index in Gleason score 6 tumours may identify prostate cancer patients suitable for surveillance. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 46(4), 247–257.
<https://doi.org/10.3109/00365599.2012.669791>

- Kachala, S. S., Bograd, A. J., Villena-Vargas, J., Suzuki, K., Servais, E. L., Kadota, K., Chou, J., Sima, C. S., Vertes, E., Rusch, V. W., Travis, W. D., Sadelain, M., & Adusumilli, P. S. (2014). Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, *20*(4), 1020–1028. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1862>
- Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., & Nakano, H. (2003). SPECIAL REVIEW SERIES: Up-to-date basic science of epithelial ovarian cancer Histological classification of ovarian cancer. In *Med Electron Microsc* (Vol. 36).
- Kallioniemi, O.-P., Wagner, U., Kononen, J., & Sauter, G. (2001). Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 10, Issue 7).
- Karamitopoulou, E., Perentes, E., Tolnay, M., & Probst, A. (1998). *Prognostic Significance of MIB-1, p53, and bcl-2 Immunoreactivity in Meningiomas*.
- Kauff, N. D., Domchek, S. M., Friebel, T. M., Robson, M. E., Lee, J., Garber, J. E., Isaacs, C., Evans, D. G., Lynch, H., Eeles, R. A., Neuhausen, S. L., Daly, M. B., Matloff, E., Blum, J. L., Sabbatini, P., Barakat, R. R., Hudis, C., Norton, L., Offit, K., & Rebbeck, T. R. (2008). Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: A multicenter, prospective study. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(8), 1331–1337. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9626>
- Kayıkç, F., Lu, I. ¯, Kose, M. F., Kose, K., Boran, N., Aliskan, A., & Tulunay, G. (2001). Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in advanced epithelial ovarian carcinoma. In *Int J Gynecol Cancer* (Vol. 11).
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 7, Issue 8, pp. 573–584). <https://doi.org/10.1038/nrc2167>
- Kim, A., Ueda, Y., Naka, T., & Enomoto, T. (2012). Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *31*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-14>

- Kim, S., Kim, B., & Song, Y. S. (2016). Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. In *Cancer Science* (Vol. 107, Issue 9, pp. 1173–1178). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cas.12987>
- Kindelberger, D. W., Lee, Y., Miron, A., Hirsch, M. S., Feltmate, C., Medeiros, F., Callahan, M. J., Garner, E. O., Gordon, R. W., Birch, C., Berkowitz, R. S., Muto, M. G., & Crum, C. P. (2007). *Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship*. <http://www.umd.be:2072/IFAMTP53A.shtml>
- King, M.-C., Marks, J. H., Mandell, J. B., Ben-Yishay, M., Dutcher, J. P., Gross, S. J., Runowicz, C. D., Venkatraj, U., Israel Medical Center Katherine Daley, B., Havens, G., Penchaszadeh, V. B., Petersen, B., Pressman, P., Antman, K. H., Cancer Center Robin Camhi Baum, S.-K., Borgen, P., Brown, K. L., Glogowski, E., Haas, B. R., ... Shappell, H. L. (2003). Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. In *SCIENCE* (Vol. 302). www.sciencemag.org
- Klöppel, G., Perren, A., & Heitz, P. U. (2004). The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: The WHO classification. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1014, pp. 13–27). New York Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1196/annals.1294.002>
- Kohandel, M., Sivaloganathan, S., & Oza, A. (2006). Mathematical modeling of ovarian cancer treatments: Sequencing of surgery and chemotherapy. *Journal of Theoretical Biology*, 242(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.02.001>
- Konecny, G. E., Wang, C., Hamidi, H., Winterhoff, B., Kalli, K. R., Dering, J., Ginther, C., Chen, H. W., Dowdy, S., Cliby, W., Gostout, B., Podratz, K. C., Keeney, G., Wang, H. J., Hartmann, L. C., Slamon, D. J., & Goode, E. L. (2014). Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(10). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju249>
- kononen1998*. (n.d.).

- Koulouris, C. R., & Penson, R. T. (2009). Ovarian Stromal and Germ Cell Tumors. *Seminars in Oncology*, 36(2), 126–136. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2008.12.004>
- Kroeze, S. G. C., Bijenhof, A. M., Bosch, J. L. H. R., & Jans, J. J. M. (2010). Diagnostic and prognostic tissue markers in clear cell and papillary renal cell carcinoma. In *Cancer Biomarkers* (Vol. 7, Issue 6, pp. 261–268). <https://doi.org/10.3233/CBM-2010-0195>
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., McGuffog, L., Evans, D. G., Barrowdale, D., Frost, D., ... Olsson, H. (2017). Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA*, 317(23), 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
- Kumar, B., De Silva, M., Venter, D. J., & Armes, J. E. (2004). Tissue microarrays: A practical guide. *Pathology*, 36(4), 295–300. <https://doi.org/10.1080/00313020410001721555>
- Kuribayashi, K., Mayes, P. A., & El-Deiry, W. S. (2006). What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 5, Issue 7, pp. 763–765). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.7.3228>
- Kurman, R. J., & Shih, I. M. (2008). Pathogenesis of ovarian cancer: Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. In *International Journal of Gynecological Pathology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 151–160). <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e318161e4f5>
- Kurman, R. J., & Shih, I. M. (2016). The dualistic model of ovarian carcinogenesis revisited, revised, and expanded. In *American Journal of Pathology* (Vol. 186, Issue 4, pp. 733–747). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>
- La Vecchia, C. (2017). Ovarian cancer: Epidemiology and risk factors. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(1), 55–62. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000217>

- Laing, R., Gillan, V., & Devaney, E. (2017). Ivermectin – Old Drug, New Tricks? In *Trends in Parasitology* (Vol. 33, Issue 6, pp. 463–472). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>
- Lee, Y., Miron, A., Drapkin, R., Nucci, M. R., Medeiros, F., Saleemuddin, A., Garber, J., Birch, C., Mou, H., Gordon, R. W., Cramer, D. W., McKeon, F. D., & Crum, C. P. (2007). A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *Journal of Pathology*, 211(1), 26–35. <https://doi.org/10.1002/path.2091>
- Lei, Q., Huang, X., Zheng, L., Zheng, F., Dong, J., Chen, F., & Zeng, W. (2022). Biosensors for Caspase-3: From chemical methodologies to biomedical applications. In *Talanta* (Vol. 240). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123198>
- Leitao, M. M., Soslow, R. A., Baergen, R. N., Olvera, N., Arroyo, C., & Boyd, J. (2004). Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 93(2), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.01.043>
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. In *American Journal of Pathology* (Vol. 177, Issue 3, pp. 1053–1064). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100105>
- Lespine, A., Dupuy, J., Orłowski, S., Nagy, T., Glavinas, H., Krajcsi, P., & Alvinerie, M. (2006). Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chemico-Biological Interactions*, 159(3), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.11.002>
- Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. In *The Lancet* (Vol. 393, Issue 10177, pp. 1240–1253). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2)
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Predictive Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1566–1572). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>

- Li, N., & Zhan, X. (2020). Anti-parasite drug ivermectin can suppress ovarian cancer by regulating lncRNA-EIF4A3-mRNA axes. *EPMA Journal*, *11*(2), 289–309. <https://doi.org/10.1007/s13167-020-00209-y>
- Li, Y., Wang, M., Zhi, P., You, J., & Gao, J.-Q. (2018). Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 2). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Li, Z., Wang, Y., Wu, L., Dong, Y., Zhang, J., Chen, F., Xie, W., Huang, J., & Lu, N. (2019). Apurinic endonuclease 1 promotes the cisplatin resistance of lung cancer cells by inducing Parkin-mediated mitophagy. *Oncology Reports*, *42*(6), 2245–2254. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7345>
- Limpachayaporn, P., Schäfers, M., & Haufe, G. (2015). Isatin sulfonamides: Potent caspases-3 and -7 inhibitors, and promising PET and SPECT radiotracers for apoptosis imaging. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 7, Issue 9, pp. 1173–1196). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.52>
- Lin, L., Fuchs, J., Li, C., Olson, V., Bekaii-Saab, T., & Lin, J. (2011). STAT3 signaling pathway is necessary for cell survival and tumorsphere forming capacity in ALDH +/CD133 + stem cell-like human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *416*(3–4), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.112>
- Lisio, M. A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z. H., & Telleria, C. (2019). High-grade serous ovarian cancer: Basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>
- Liu, P. F., Hu, Y. C., Kang, B. H., Tseng, Y. K., Wu, P. C., Liang, C. C., Hou, Y. Y., Fu, T. Y., Liou, H. H., Hsieh, I. C., Ger, L. P., & Shu, C. W. (2017). Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, *12*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180620>
- Liu, Y., Fu, Y., Hu, X., Chen, S., Miao, J., Wang, Y., Zhou, Y., & Zhang, Y. (2020). Caveolin-1 knockdown increases the therapeutic sensitivity of lung cancer to

- cisplatin-induced apoptosis by repressing Parkin-related mitophagy and activating the ROCK1 pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 1197–1208. <https://doi.org/10.1002/jcp.29033>
- Lokich, E., Singh, R. K., Han, A., Romano, N., Yano, N., Kim, K., & Moore, R. G. (2014). HE4 expression is associated with hormonal elements and mediated by importin-dependent nuclear translocation. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep05500>
- Luo, Y., Dallaglio, K., Chen, Y., Robinson, W. A., Robinson, S. E., McCarter, M. D., Wang, J., Gonzalez, R., Thompson, D. C., Norris, D. A., Roop, D. R., Vasiliou, V., & Fujita, M. (2012). ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells*, 30(10), 2100–2113. <https://doi.org/10.1002/stem.1193>
- Lutgendorf, S. K., De Geest, K., Bender, D., Ahmed, A., Goodheart, M. J., Dahmouch, L., Zimmerman, M. B., Penedo, F. J., Lucci, J. A., Ganjei-Azar, P., Thaker, P. H., Mendez, L., Lubaroff, D. M., Slavich, G. M., Cole, S. W., & Sood, A. K. (2012). Social influences on clinical outcomes of patients with ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(23), 2885–2890. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.4411>
- Lutgendorf, S. K., Slavich, G. M., Degeest, K., Goodheart, M., Bender, D., Thaker, P. H., Penedo, F., Zimmerman, B., Lucci, J., Mendez, L., Collins, K., & Sood, A. K. (2013). Non-cancer life stressors contribute to impaired quality of life in ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncology*, 131(3), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.09.025>
- Macdonald, S., Macleod, U., Campbell, N. C., Weller, D., & Mitchell, E. (2006). Systematic review of factors influencing patient and practitioner delay in diagnosis of upper gastrointestinal cancer. *British Journal of Cancer*, 94(9), 1272–1280. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603089>
- Malpica, A., Deavers, M. T., Lu, K., Bodurka, D. C., Atkinson, E. N., Gershenson, D. M., & Silva, E. G. (2004). *Grading Ovarian Serous Carcinoma Using a Two-Tier System*.

- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016d). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>
- Mavaddat, N., Barrowdale, D., Andrulis, I. L., Domchek, S. M., Eccles, D., Nevanlinna, H., Ramus, S. J., Spurdle, A., Robson, M., Sherman, M., Mulligan, A. M., Couch, F. J., Engel, C., McGuffog, L., Healey, S., Sinilnikova, O. M., Southey, M. C., Terry, M. B., Goldgar, D., ... Antoniou, A. C. (2012). Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 21(1), 134–147. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0775>
- Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: Individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. (2015). *The Lancet*, 385(9980), 1835–1842. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61687-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61687-1)
- Micci, F., Haugom, L., Abeler, V. M., Davidson, B., Tropé, C. G., & Heim, S. (2014). *Genomic profile of ovarian carcinomas*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/315>
- Miyama, T., Takanaga, H., Matsuo, H., Yamano, K., Yamamoto, K., Iga, T., Naito, M., Tsuruo, T., Ishizuka, H., Kawahara, Y., & Sawada, Y. (1998). *P-Glycoprotein-Mediated Transport of Itraconazole across the Blood-Brain Barrier* (Vol. 42, Issue 7). <https://journals.asm.org/journal/aac>
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., & Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. In *International Journal of Women's Health* (Vol. 11, pp. 287–299). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>
- Morello, A., Sadelain, M., & Adusumilli, P. S. (2016). Mesothelin-targeted CARs: Driving T cells to solid Tumors. In *Cancer Discovery* (Vol. 6, Issue 2, pp. 133–146).

American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0583>

Mosca, L., Ilari, A., Fazi, F., Assaraf, Y. G., & Colotti, G. (2021). Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resistance Updates*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100742>

Murakami, E., Shionoya, T., Komenoi, S., Suzuki, Y., & Sakane, F. (2016). Cloning and characterization of novel testis-Specific diacylglycerol kinase η splice variants 3 and 4. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone>

Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 5, pp. 333–340). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>

NEJMoa052985. (n.d.).

Norquist, B. M., Harrell, M. I., Brady, M. F., Walsh, T., Lee, M. K., Gulsuner, S., Bernards, S. S., Casadei, S., Yi, Q., Burger, R. A., Chan, J. K., Davidson, S. A., Mannel, R. S., DiSilvestro, P. A., Lankes, H. A., Ramirez, N. C., King, M. C., Swisher, E. M., & Birrer, M. J. (2016). Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncology*, 2(4), 482–490. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5495>

Nunes, M., Duarte, D., Vale, N., & Ricardo, S. (2023). The Antineoplastic Effect of Carboplatin Is Potentiated by Combination with Pitavastatin or Metformin in a Chemoresistant High-Grade Serous Carcinoma Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010097>

Nunes, M., Nunes, D., & Ricardo, S. (2023). Cell Microarray: An Approach to Evaluate Drug-Induced Alterations in Protein Expression. In *Advancements in Cancer Research* (pp. 133–144). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/cell-microarray>

Nunes, M., Silva, P. M. A., Coelho, R., Pinto, C., Resende, A., Bousbaa, H., Almeida, G. M., & Ricardo, S. (2021). Generation of Two Paclitaxel-Resistant High-Grade Serous Carcinoma Cell Lines With Increased Expression of P-Glycoprotein. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.752127>

093-013. (n.d.).

Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., Mori, T., & Yasui, A. (2003). Spatial and Temporal Cellular Responses to Single-Strand Breaks in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3974–3981. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.11.3974-3981.2003>

Oliver, K. E., & McGuire, W. P. (2014). Ovarian cancer and antiangiogenic therapy: Caveat emptor. *Journal of Clinical Oncology*, 32(30), 3353–3356. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.4574>

Pastan, I., & Hassan, R. (2014). Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. In *Cancer Research* (Vol. 74, Issue 11, pp. 2907–2912). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0337>

Peres, L. C., Cushing-Haugen, K. L., Köbel, M., Harris, H. R., Berchuck, A., Rossing, M. A., Schildkraut, J. M., & Doherty, J. A. (2019). Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage. *Journal of the National Cancer Institute*, 111(1). <https://doi.org/10.1093/jnci/djy071>

Perren, T. J., Swart, A. M., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M. S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., Bois, A. du, Shouli, J., Kimmig, R., Stähle, A., Collinson, F., Essapen, S., Gourley, C., Lortholary, A., Selle, F., ... Oza, A. M. (2011). A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 365(26), 2484–2496. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1103799>

Piccart, M. J., Bertelsen, K., James, K., Cassidy, J., Mangioni, C., Simonsen, E., Stuart, G., Kaye, S., Vergote, I., Blom, R., Grimshaw, R., Atkinson, R. J., Swenerton, K. D., Trope, C., Nardi, M., Kaern, J., Tumolo, S., Timmers, P., Roy, J.-A., ... Pecorelli, S. (n.d.). *Randomized Intergroup Trial of Cisplatin-Paclitaxel Versus Cisplatin-Cyclophosphamide in Women With Advanced Epithelial Ovarian Cancer: Three-Year Results*. <http://jnci.oxfordjournals.org/>

Pignata, S., Scambia, G., Ferrandina, G., Savarese, A., Sorio, R., Breda, E., Gebbia, V., Musso, P., Frigerio, L., Del Medico, P., Lombardi, A. V., Febbraro, A., Scollo, P., Ferro, A., Tamberi, S., Brandes, A., Ravaioli, A., Valerio, M. R., Aitini, E., ... Perrone, F. (2011). Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated

- liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: The MITO-2 randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29(27), 3628–3635. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.8566>
- Prat, J. (2012). Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. In *Virchows Archiv* (Vol. 460, Issue 3, pp. 237–249). <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1203-5>
- Prueksaritanont, T., Chu, X., Evers, R., Klopfer, S. O., Caro, L., Kothare, P. A., Dempsey, C., Rasmussen, S., Houle, R., Chan, G., Cai, X., Valesky, R., Fraser, I. P., & Stoch, S. A. (2014). Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(3), 587–598. <https://doi.org/10.1111/bcp.12377>
- Pu, R. T., Giordano, T. J., & Michael, C. W. (2008). Utility of cytology microarray constructed from effusion cell blocks for immunomarker validation. *Cancer*, 114(5), 300–306. <https://doi.org/10.1002/cncr.23797>
- Purdie, D. M., Webb, P. M., Siskind, V., Bain, C. J., & Green, A. C. (2003). The different etiologies of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancers. In *Gynecologic oncology* (Vol. 88, Issue 1 Pt 2). <https://doi.org/10.1006/gyno.2002.6706>
- Ray Chaudhuri, A., & Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 10, pp. 610–621). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
- Richani, K., Romero, R., Kim, Y. M., Cushenberry, E., Soto, E., Han, Y. M., Espinoza, J., & Kim, C. J. (2006). Tissue microarray: An effective high-throughput method to study the placenta for clinical and research purposes. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 19(8), 509–515. <https://doi.org/10.1080/14767050600852718>
- Rickard, B. P., Conrad, C., Sorrin, A. J., Ruhi, M. K., Reader, J. C., Huang, S. A., Franco, W., Scarcelli, G., Polacheck, W. J., Roque, D. M., Del Carmen, M. G., Huang, H. C., Demirci, U., & Rizvi, I. (2021). Malignant ascites in ovarian cancer: Cellular, acellular, and biophysical determinants of molecular characteristics and therapy response. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13174318>

- Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 897–907). <https://doi.org/10.1038/nrm1496>
- Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., & Piña, E. (1997). Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. In *Article in Archives of Medical Research*. <https://www.researchgate.net/publication/13800996>
- Rizk, N. P., Servais, E. L., Tang, L. H., Sima, C. S., Gerdes, H., Fleisher, M., Rusch, V. W., & Adusumilli, P. S. (2012). Tissue and serum mesothelin are potential markers of neoplastic progression in Barrett's associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 21(3), 482–486. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0993>
- Robb, K., Stubbings, S., Ramirez, A., Macleod, U., Austoker, J., Waller, J., Hiom, S., & Wardle, J. (2009). Public awareness of cancer in Britain: A population-based survey of adults. *British Journal of Cancer*, 101, S18–S23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605386>
- Rooth, C. (2013). Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. In *British Journal of Nursing* (Vol. 22, Issue 17). www.fannin.eu
- Routila, J., Suvila, K., Grénman, R., Leivo, I., Westermarck, J., & Ventelä, S. (2021). Cancer cell line microarray as a novel screening method for identification of radioresistance biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08618-6>
- Rubin, M. A., Dunn, R., Strawderman, M., & Pienta, K. J. (2002). *Tissue Microarray Sampling Strategy for Prostate Cancer Biomarker Analysis*.
- Rybczynska, A. A., Boersma, H. H., de Jong, S., Gietema, J. A., Noordzij, W., Dierckx, R. A. J. O., Elsinga, P. H., & van Waarde, A. (2018). Avenues to molecular imaging of dying cells: Focus on cancer. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 38, Issue 6, pp. 1713–1768). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/med.21495>
- Salani, R., Kurman, R. J., Giuntoli, R., Gardner, G., Bristow, R., Wang, T. L., & Shih, I. M. (2008). Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does

- not correlate with drug resistance. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(3), 487–491. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01039.x>
- Salehi, F., Dunfield, L., Phillips, K. P., Krewski, D., & Vanderhyden, B. C. (2008). Risk factors for ovarian cancer: An overview with emphasis on hormonal factors. In *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 11, Issues 3–4, pp. 301–321). <https://doi.org/10.1080/10937400701876095>
- Sandadi, S., Frasure, H. E., Broderick, M. J., Waggoner, S. E., Miller, J. A., & Von Gruenigen, V. E. (2011). The effect of sleep disturbance on quality of life in women with ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 123(2), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.07.028>
- schilder1990*. (n.d.).
- Schlifter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H. G., Key, G., Flad, H.-D., & Gerdes, J. (n.d.). *The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cycle-maintaining Proteins*.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). *The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown*.
- Schouten, L. J., Rivera, C., Hunter, D. J., Spiegelman, D., Adami, H. O., Arslan, A., Beeson, W. L., Van Den Brandt, P. A., Buring, J. E., Folsom, A. R., Fraser, G. E., Freudenheim, J. L., Goldbohm, R. A., Hankinson, S. E., Lacey, J. V., Leitzmann, M., Lukanova, A., Marshall, J. R., Miller, A. B., ... Smith-Warner, S. A. (2008). Height, body mass index, and ovarian cancer: A pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(4), 902–912. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2524>
- Schwartz, P. E., Rutherford, T. J., Chambers, J. T., Kohorn, E. I., & Thiel, R. P. (1999). *Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Ovarian Cancer: Long-Term Survival*. <http://www.idealibrary.com>
- Seelig, A. (2020). P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.576559>

- Seidman, J. D., Horkayne-Szakaly, I., Cosin, J. A., Ryu, H. S., Haiba, M., Boice, C. R., & Yemelyanova, A. V. (2006). Testing of two binary grading systems for FIGO stage III serous carcinoma of the ovary and peritoneum. *Gynecologic Oncology*, *103*(2), 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.05.030>
- Sergi, C. (Ed.). (2023). *Advancements in Cancer Research*. Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/advancements-in-cancer-research>
- Servais, E. L., Colovos, C., Rodriguez, L., Bograd, A. J., Nitadori, J. I., Sima, C., Rusch, V. W., Sadelain, M., & Adusumilli, P. S. (2012). Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. *Clinical Cancer Research*, *18*(9), 2478–2489. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2614>
- Shirendeb, U., Hishikawa, Y., Moriyama, S., Win, N., Thu, M. M. M., Mar, K. S., Khatanbaatar, G., Masuzaki, H., & Koji, T. (2009). Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar. *Acta Histochemica et Cytochemica*, *42*(6), 181–190. <https://doi.org/10.1267/ahc.09030>
- Singer, G., Iii, R. O., Cohen, Y., Wang, B. G., Sidransky, D., Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2003). *BRIEF COMMUNICATION Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma*. <http://jnci.oxfordjournals.org/>
- Singer, G., Stöhr, R., Cope, L., Dehari, R., Hartmann, A., Cao, D.-F., Wang, T.-L., Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (n.d.). *Patterns of p53 Mutations Separate Ovarian Serous Borderline Tumors and Low-and High-grade Carcinomas and Provide Support for a New Model of Ovarian Carcinogenesis A Mutational Analysis With Immunohistochemical Correlation*.
- Skacel, M., Skilton, B., Pettay, J. D., & Tubbs, R. R. (2002). *Tissue Microarrays: A Powerful Tool for High-Throughput Analysis of Clinical Specimens A Review of the Method With Validation Data*.
- Slade, D. (2020). PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. In *Genes and Development* (Vol. 34, Issue 5, pp. 360–394). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.334516.119>

- Sobue, S., Mizutani, N., Aoyama, Y., Kawamoto, Y., Suzuki, M., Nozawa, Y., Ichihara, M., & Murate, T. (2016). Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4), 808–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.128>
- Song, Y., & Brady, S. T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 3, pp. 125–136). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004>
- Sophos, N. A., & Vasiliou, V. (n.d.). *Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update*. <http://www.uchsc.edu/sp/sp/alcdbase/aldhcov.html>.
- Sorbye, S. W., Kilvaer, T. K., Valkov, A., Donnem, T., Smeland, E., Al-Shibli, K., Bremnes, R. M., & Busund, L. T. (2012). Prognostic impact of CD57, CD68, M-CSF, CSF-1R, Ki67 and TGF-beta in soft tissue sarcomas. *BMC Clinical Pathology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-12-7>
- Steed, H., Ozay, A. M., Murphy, J., Laframboise, S., Lockwoodz, G., De Petrillo, D., Sturgeon, J., & Rosen, B. (n.d.). *A retrospective analysis of neoadjuvant platinum-based chemotherapy versus up-front surgery in advanced ovarian cancer*.
- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. In *Seminars in Oncology Nursing* (Vol. 35, Issue 2, pp. 151–156). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
- Stuart, G. C. E., Kitchener, H., Bacon, M., DuBois, A., Friedlander, M., Ledermann, J., Marth, C., Thigpen, T., & Trimble, E. (2011). 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GFIG) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: Report from the fourth ovarian cancer consensus conference. *International Journal of Gynecological Cancer*, 21(4), 750–755. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31821b2568>
- Sun, Y., Shen, W., Hu, S., Lyu, Q., Wang, Q., Wei, T., Zhu, W., & Zhang, J. (2023). METTL3 promotes chemoresistance in small cell lung cancer by inducing mitophagy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 42(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02638-9>

- Surwit, E., Childers, J., Atlas, I., Nour, M., Hatch, K., Hallum, A., & Alberts, D. (1996). Neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer. In *Int J Gynecol Cancer* (Vol. 6).
- Tapaninen, T., Backman, J. T., Kurkinen, K. J., Neuvonen, P. J., & Niemi, M. (2011). Itraconazole, a P-glycoprotein and CYP3A4 inhibitor, markedly raises the plasma concentrations and enhances the renin-inhibiting effect of aliskiren. *Journal of Clinical Pharmacology*, *51*(3), 359–367. <https://doi.org/10.1177/0091270010365885>
- Tazzari, P. L., Bontadini, A., Gobbi, M., Tassi, C., Dinota, A., Visani, G., Michieli, M. G., Pileri, S., Baccarani, M., & Tura, S. (1990). Comparison of the DNA content, bromodeoxyuridine incorporation and ki-67 antigen expression in human acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, *3*(1), 45–51. <https://doi.org/10.3109/10428199009050974>
- Telloni, S. M. (2017). Tumor staging and grading: A primer. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1606, pp. 1–17). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1
- Testa, U., Petrucci, E., Pasquini, L., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines*, *5*(1), 16. <https://doi.org/10.3390/medicines5010016>
- Thomas, A., Chen, Y., Steinberg, S. M., Luo, J., Pack, S., Raffeld, M., Abdullaev, Z., Alewine, C., Rajan, A., Giaccone, G., Pastan, I., Miettinen, M., & Hassan, R. (n.d.). High mesothelin expression in advanced lung adenocarcinoma is associated with KRAS mutations and a poor prognosis. In *Oncotarget* (Vol. 6, Issue 13). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Tossetta, G., & Inversetti, A. (2023). Ovarian Cancer: Advances in Pathophysiology and Therapies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24108930>
- Tothill, R. W., Tinker, A. V., George, J., Brown, R., Fox, S. B., Lade, S., Johnson, D. S., Trivett, M. K., Etemadmoghadam, D., Locandro, B., Traficante, N., Fereday, S.,

Hung, J. A., Chiew, Y. E., Haviv, I., Gertig, D., Defazio, A., & Bowtell, D. D. L. (2008). Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clinical Cancer Research*, *14*(16), 5198–5208. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0196>

Toward the Development of a Universal Grading System for Ovarian Epithelial Carcinoma Testing of a Proposed System in a Series of 461 Patients with Uniform Treatment and Follow-Up. (n.d.).

Tworoger, S. S., Fairfield, K. M., Colditz, G. A., Rosner, B. A., & Hankinson, S. E. (2007). Association of oral contraceptive use, other contraceptive methods, and infertility with ovarian cancer risk. *American Journal of Epidemiology*, *166*(8), 894–901. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm157>

Ushijima, K. (2009). Current status of gynecologic cancer in Japan. In *Journal of Gynecologic Oncology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 67–71). <https://doi.org/10.3802/jgo.2009.20.2.67>

Vasey, P. A., Jayson, G. C., Gordon, A., Gabra, H., Coleman, R., Atkinson, R., Parkin, D., Paul, J., Hay, A., & Kaye, S. B. (2004). Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*(22), 1682–1691. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh323>

Vecchia, C. La, Altieri, A., Franceschi, S., & Tavani, A. (n.d.). *Oral Contraceptives and Cancer An Update.*

Vergote, I., De Wever, I., Tjalma, W., Van Gramberen, M., Decloedt, J., & Van Dam, P. (1998). *Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Debulking Surgery in Advanced Ovarian Carcinoma: A Retrospective Analysis of 285 Patients.*

Verhaak, R. G. W., Tamayo, P., Yang, J. Y., Hubbard, D., Zhang, H., Creighton, C. J., Fereday, S., Lawrence, M., Carter, S. L., Mermel, C. H., Kostic, A. D., Etemadmoghadam, D., Saksena, G., Cibulskis, K., Duraisamy, S., Levanon, K., Sougnez, C., Tsherniak, A., Gomez, S., ... Meyerson, M. (2013). Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 517–525. <https://doi.org/10.1172/JCI65833>

- Visus, C., Ito, D., Amoscato, A., Maciejewska-Franczak, M., Abdelsalem, A., Dhir, R., Shin, D. M., Donnenberg, V. S., Whiteside, T. L., & DeLeo, A. B. (2007). Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member a1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research*, *67*(21), 10538–10545. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1346>
- Wang, K., Gao, W., Dou, Q., Chen, H., Li, Q., Nice, E. C., & Huang, C. (2016). Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer. In *Autophagy* (Vol. 12, Issue 12, pp. 2498–2499). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1231494>
- Wang, Y. C., Yo, Y. Te, Lee, H. Y., Liao, Y. P., Chao, T. K., Su, P. H., & Lai, H. C. (2012). ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome. *American Journal of Pathology*, *180*(3), 1159–1169. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.015>
- Wang, Y., Yin, B., Li, D., Wang, G., Han, X., & Sun, X. (2018). GSDME mediates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(1), 1418–1425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.156>
- Waterworth, A., Hanby, A., & Speirs, V. (n.d.). A NOVEL CELL ARRAY TECHNIQUE FOR HIGH-THROUGHPUT, CELL-BASED ANALYSIS. In *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* (Vol. 41).
- Watson, P., Vasen, H. F. A., Mecklin, J. P., Bernstein, I., Aarnio, M., Järvinen, H. J., Myrhoj, T., Sunde, L., Wijnen, J. T., & Lynch, H. T. (2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International Journal of Cancer*, *123*(2), 444–449. <https://doi.org/10.1002/ijc.23508>
- Weaver, A. N., & Yang, E. S. (2013). Beyond DNA repair: Additional functions of PARP-1 in cancer. *Frontiers in Oncology*, *3* NOV. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00290>
- Weidle, U. H., Birzele, F., Kollmorgen, G., & Rueger, R. (2016). Mechanisms and targets involved in dissemination of ovarian cancer. In *Cancer Genomics and Proteomics*

- (Vol. 13, Issue 6, pp. 407–424). International Institute of Anticancer Research. <https://doi.org/10.21873/cgp.20004>
- Wen, C.-H., Su, Y.-C., Wang, S.-L., Yang, S.-F., & Chai, C.-Y. (n.d.). *Jan2007: Application of the Microarray Technique to Cell Blocks*.
- Whittemore, A. S., Balise, R. R., Pharoah, P. D. P., DiCioccio, R. A., Oakley-Girvan, I., Ramus, S. J., Daly, M., Usinowicz, M. B., Garlinghouse-Jones, K., Ponder, B. A. J., Buys, S., Senie, R., Andrulis, I., John, E., Hopper, J. L., & Piver, M. S. (2004). Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *British Journal of Cancer*, *91*(11), 1911–1915. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602239>
- Willner, J., Wurz, K., Allison, K. H., Galic, V., Garcia, R. L., Goff, B. A., & Swisher, E. M. (2007). Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Human Pathology*, *38*(4), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.10.007>
- Winter, W. E., Maxwell, G. L., Tian, C., Carlson, J. W., Ozols, R. F., Rose, P. G., Markman, M., Armstrong, D. K., Muggia, F., & McGuire, W. P. (2007). Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(24), 3621–3627. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.2517>
- Winter, W. E., Maxwell, G. L., Tian, C., Sundborg, M. J., Rose, G. S., Rose, P. G., Rubin, S. C., Muggia, F., & McGuire, W. P. (2008). Tumor residual after surgical cytoreduction in prediction of clinical outcome in stage IV epithelial ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(1), 83–89. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1953>
- Wloga, D., Joachimiak, E., & Fabczak, H. (2017). Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18102207>
- Wright, J. D., Herzog, T. J., Neugut, A. I., Burke, W. M., Lu, Y. S., Lewin, S. N., & Hershman, D. L. (2012). Effect of radical cytoreductive surgery on omission and delay of chemotherapy for advanced-stage ovarian cancer. *Obstetrics and Gynecology*, *120*(4), 871–881. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31826981de>

- Xia, L., Wen, L., Qin, Y., Dobson, H. E., Zhang, T., Comer, F. I., Hinrichs, M. J., Oberst, M. D., Coats, S. R., Chang, A. E., Liu, Y., Bao, Y., Dai, F., Wicha, M. S., & Li, Q. (2021). HER2-targeted antibody-drug conjugate induces host immunity against cancer stem cells. *Cell Chemical Biology*, 28(5), 610-624.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.02.013>
- Yadav, P., Yadav, R., Jain, S., & Vaidya, A. (2021). Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. In *Chemical Biology and Drug Design* (Vol. 98, Issue 1, pp. 144–165). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13860>
- Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M., & Gelmon, K. A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. In *The Lancet Oncology* (Vol. 11, Issue 2, pp. 174–183). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70262-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70262-1)
- Yu, J.-Y., Deruiter, S. L., & Turner, D. L. (2002). *RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.092143499
- Zhang, X., Wei, X., Shi, L., Jiang, H., Ma, F., Li, Y., Li, C., Ma, Y., & Ma, Y. (2025). The latest research progress: Active components of Traditional Chinese medicine as promising candidates for ovarian cancer therapy. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 337). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118811>