



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**  
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RICARDO JOÃO ROQUE

***A IMPORTÂNCIA DA E-CADERINA NA METASTIZAÇÃO  
INTRA-ABDOMINAL DO CANCRO DO OVÁRIO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:  
PROFESSORA DOUTORA MARIA MARGARIDA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO DIAS

NOVEMBRO/2017

## Índice

Lista de Abreviaturas .....	2
Resumo.....	3
Abstract .....	4
Introdução.....	5
Materiais e Métodos .....	10
Expressão e Função da E-caderina no Tumor Primário .....	12
Influência do Microambiente Tumoral na Expressão da E-caderina .....	14
Desagregação Tumoral e Formação da Efusão Celular Maligna.....	18
Agregados Multicelulares como Mecanismo de Sobrevivência e Resistência .....	23
Heterogeneidade dos Esferoides na Adesão Mesotelial.....	27
Conclusão.....	30
Agradecimentos.....	34
Referências Bibliográficas .....	35
Anexos.....	41

## Lista de Abreviaturas

- AEG-1** – Astrocyte elevated gene-1
- AREG** – Amphiregulin
- EGF** – Epidermal Growth Factor
- EGFR** – Epidermal growth factor receptor
- ERK** – Extracellular signal-regulated kinase
- ESO** – Epitélio superficial do ovário
- FIGO** – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
- HER2** – Human epidermal growth factor receptor 2
- HIF1- $\alpha$**  – Hypoxia-inducible factor 1-alpha
- LOX** – Lysyl oxidase
- KDa** – Kilodalton
- MAPK** – Mitogen-activated protein kinase
- MCAs** – Multicellular aggregates
- MEK** – MAPK/ERK Kinase
- miR** – micro RNA
- MMP** – Matrix metalloproteinases
- MKK4** – Mitogen-activated protein kinase kinase 4
- mRNA** – messenger RNA
- MUC1** – Mucin 1
- PI3K** – Phosphatidylinositol 3-kinase
- PKB** – Protein kinase B
- ROS** – Reactive oxygen species
- ZEB1** – Zinc finger E-box-binding homeobox 1
- ZEB2** – Zinc finger E-box-binding homeobox 2

## Resumo

O carcinoma do ovário continua a ser uma neoplasia com elevadas taxas de mortalidade, apesar de o seu processo de metastização ser quase exclusivamente intra-abdominal. Este deve-se a alterações na dinâmica e interações intercelulares, mediadas por múltiplas moléculas de adesão e integrinas, entre as quais é considerada da maior importância a E-caderina. Durante muitos anos a sobreexpressão desta molécula foi considerada inversamente proporcional à capacidade de invasão do tumor e como sendo dotada de um papel supressor tumoral. Contudo, no que respeita ao carcinoma do ovário, sabe-se atualmente que tem uma expressividade dinâmica e um papel muito mais complexo. Inicialmente a elevada expressão da E-caderina é considerada um sinal de metaplasia no epitélio ovárico normal, estando associada à proliferação celular. Posteriormente é a diminuição da sua expressão que permite a aquisição de um fenótipo mais invasivo, possibilitando a desagregação do tumor primário e colonização do líquido peritoneal por células tumorais. Esta subexpressão parece estar dependente de complexos mecanismos de regulação, com significativa interferência do microambiente, como é o caso da proteólise. De forma complexa, a clivagem da E-caderina e os fragmentos resultantes parecem ser essenciais ao processo de disseminação e, inclusivamente, à formação de agregados multicelulares, que permitem a sobrevivência das células em suspensão no líquido peritoneal. Paradoxalmente, a manutenção de alguma expressão de E-caderina parece promover a adesão intercelular, resistência e sobrevivência desses mesmos agregados. Já no que respeita à adesão mesotelial, a E-caderina não parece ter uma função relevante, embora a subexpressão desta molécula esteja associada a uma capacidade aumentada de metastização.

Palavras Chave: cancro do ovário; metástases peritoneais; E-caderina; molécula de adesão.

## **Abstract**

The ovarian carcinoma remains to have high mortality rates, although its metastatic process is almost exclusively intra-abdominal. This is due to changes in the intercellular dynamics and interactions, mediated by multiple adhesion molecules and integrins, among which E-cadherin is considered of the utmost importance. For many years the overexpression of this molecule was considered as inversely proportional to the tumoral capacity of invasion and as being endowed with a tumor suppressor role. However, as far as ovary carcinoma is concerned, E-cadherin is now known to have a dynamic expression and a much more complex role. Initially, high E-cadherin expression is considered a sign of metaplasia in the normal ovarian epithelium, being associated with cell proliferation. Subsequently it is the decrease of its expression that allows the acquisition of a more invasive phenotype, allowing the disintegration of the primary tumor and colonization of the peritoneal fluid by tumor cells. This sub-expression seems to be in the dependence of complex regulatory mechanisms, with significant interference of the microenvironment, such as proteolysis. Complexly, cleavage of E-cadherin and the resulting fragments appear to be essential to the process of dissemination and even to the formation of multicellular aggregates, which allow the survival of cells in suspension in the peritoneal fluid. Paradoxically, the maintenance of some E-cadherin expression appears to promote intercellular adhesion, resistance, and survival of these aggregates. Regarding mesothelial adhesion, E-cadherin does not appear to have a relevant function, although the subexpression of this molecule is associated with an increased metastatic capacity.

Keywords: ovarian cancer; peritoneal metastasis; E-cadherin; adhesion molecule.

## Introdução

As neoplasias do ovário são um grupo muito heterogéneo de entidades patológicas, com diferentes etiologias, características histopatológicas e comportamento clínico (1,2). A grande maioria, dada a sua origem epitelial, classifica-se como carcinoma(3). Mais recentemente, tendo por base estudos moleculares e anátomo-patológicos, foi possível subdividir os tumores do ovário em dois “tipos” que têm uma forte correlação com o seu comportamento clínico. Os tumores do tipo I são bem diferenciados e de progressão indolente, formando-se a partir de lesões precursoras, contrariamente aos do tipo II que têm uma evolução rápida e são considerados altamente indiferenciados (“de alto grau”) (1,2). Estes últimos são de elevada agressividade clínica e biológica, comumente diagnosticados em estádios já avançados, constituindo cerca de 75% de todas as neoplasias ováricas de origem epitelial (2). A maioria das neoplasias do ovário são, assim, carcinomas que, por sua vez, no momento do diagnóstico, são com maior frequência identificados como carcinomas ováricos serosos de alto grau, do tipo II (3). O facto de na maioria dos casos se tratar de lesões rapidamente progressivas, agressivas e de mau prognóstico (3) explica o facto de o carcinoma do ovário ser a neoplasia ginecológica com maior taxa de mortalidade nos países desenvolvidos e a quinta causa de morte por cancro entre mulheres (4).

As neoplasias do ovário, na sua generalidade, iniciam muito rapidamente o processo de metastização intra-abdominal, não só por extensão direta, como também por disrupção da cápsula tumoral e libertação de células neoplásicas para a cavidade peritoneal. Estas células são capazes de sobreviver em suspensão no líquido peritoneal, individualizadas ou agregadas, podendo aderir ao mesotélio peritoneal e formar metástases em órgãos abdominais distantes (5–7). De forma complementar, a obstrução dos vasos linfáticos peritoneais causada por estas células, associada a uma exsudação excessiva proveniente da microvascularização e neovascularização tumoral, levam à acumulação de fluido peritoneal. Deste modo, mais de um

terço das doentes apresentam ascite maligna (aumento do volume de fluido peritoneal, contendo células neoplásicas) no momento do diagnóstico, sendo esta considerada quer uma consequência, quer uma condicionante do processo metastático, na medida em que as lesões intra-abdominais secundárias se encontram mais comumente em áreas de grande contacto com o líquido ascítico: o grande omento, o espaço subfrénico direito e o fundo de saco de Douglas (5).

Todavia existem doentes que na data do diagnóstico apresentam metástases retroperitoneais ou à distância, nomeadamente centralizadas no parênquima pulmonar ou hepático (8). Os gânglios linfáticos pélvicos e para-aórticos estão envolvidos em cerca de 70 a 75% dos carcinomas do ovário de estágio III-IV e existem evidências de células tumorais em circulação em doentes com cancro do ovário (8,9). Um estudo recente incluindo 176 doentes com doença metastática do ovário, mostrou que 40% destas desenvolvem metástases torácicas, frequentemente numa fase mais tardia do curso da doença (10). Deste modo, apesar de existir uma baixa frequência de metástases extra-abdominais dos carcinomas do ovário em comparação com a sua metastização abdominal, está provado que estas neoplasias possuem também uma disseminação hematogénica e linfática (9,11). É, contudo o seu mecanismo de disseminação intra-abdominal, quase transversal a todas as doentes, que está presente em estádios mais iniciais (6,12). Por ser geralmente assintomático, cerca de dois terços das doentes apresentam uma disseminação metastática peritoneal extensa no momento do diagnóstico, representando já um estágio avançado da doença, associado a mau prognóstico (13).

Segundo a classificação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) são classicamente considerados 4 estádios clínicos do carcinoma do ovário: um estágio de confinamento da doença ao tecido ovárico (estádio 1); extensão local a órgãos e tecidos pélvicos adjacentes (estádio 2); metastização para órgãos e tecidos do abdómen superior e/ou envolvimento de gânglios linfáticos (estádio 3); invasão à distância de estruturas

extraperitoneais (estádio 4) (12). De forma mais atual, o Anexo 1 mostra uma versão de 2014 desta classificação (14). A correspondência existente entre os diferentes estádios e a progressão da doença permite compreender a razão pela qual tumores no estágio 1 se correlacionam com sobrevivências globais aos 5 anos da ordem dos 90%, enquanto esta mesma sobrevivência não ultrapassa os 40% nos estádios 3 e 4 (1).

Apesar de se ter verificado nas últimas décadas uma melhoria na sobrevivência aos 5 anos, devido aos novos esquemas terapêuticos, como a associação da cirurgia de citorredução agressiva e a quimioterapia com agentes mais eficazes e dirigidos, a remissão sustentada continua a ser difícil de atingir (15,16). A sua taxa de cura não ultrapassa, em geral, os 30% (6), sendo frequentes as recorrências, mesmo após terapêutica adequada e intensiva, nos tumores mais agressivos e em estádios mais avançados (11).

Assim, tal como representado no Anexo 2, podemos definir três acontecimentos determinantes no processo de metastização intra-abdominal do carcinoma do ovário. Inicialmente ocorre a desagregação celular no tumor primitivo (fase 1). Essas células neoplásicas são libertadas para a cavidade peritoneal onde formam agregados multicelulares (MCAs, também designados de esferoides), os quais permitem a sobrevivência aos mecanismos de anoiquia (fase 2). Finalmente, estes esferoides vão sofrer desagregação, verificando-se em seguida a adesão celular à matriz sub-mesotelial do peritoneu (fase 3), levando à formação e crescimento das lesões secundárias, bem como a posterior invasão dos tecidos contíguos (4).

Os mecanismos moleculares que presidem a esta evolução neoplásica e capacidade de metastização são ainda mal compreendidos, mas é inegável o contributo das alterações da dinâmica celular, por um lado, e das interações intercelulares e das células com o meio (microambiente tumoral), por outro lado.

As caderinas são moléculas de adesão intercelular com três domínios (intracelular, transcelular e extracelular), sendo consideradas da maior importância na relação e dinâmica



intercelular. Constituem as junções aderentes, que correspondem à ligação entre duas caderinas no meio extracelular e destas com os filamentos intracelulares de actina de duas células, coordenando a forma e o movimento celular, bem como definindo o seu rearranjo espacial e características epiteliais. O seu domínio intracelular não apresenta atividade proteolítica, mas de ligação à catenina (um intermediário de ligação ao citoesqueleto de actina), o que não o impede de intervir em processos de sinalização intracelular por recrutamento de moléculas sinalizadoras para o seu terminal (4,17). Um estudo de 2011 evidenciou que para cada estágio do carcinoma ovárico seroso de alto grau existe um diferente padrão de expressão de moléculas de adesão, como a E-caderina e a N-caderina, sugerindo uma possível utilização destas moléculas como indicadores do estágio tumoral, bem como de eventuais previsores prognósticos (18).

A E-caderina é, não só, uma das moléculas mais investigadas e estudadas neste grupo, como também uma das mais presentes nas regiões de epitélio ovárico alterado (12). Apesar de, classicamente, ser considerada um agente supressor tumoral no que respeita à maioria dos tumores sólidos, parece ter uma ação muito mais complexa e ambígua no carcinoma do ovário. Adicionalmente, aparenta ter uma atividade fundamental e única no estabelecimento de metástases neste tumor (19), nomeadamente na metastização intra-abdominal.

Através desta revisão bibliográfica propõe-se interpretar, com base nas evidências atuais, o papel molecular da E-caderina no complexo e característico processo de metastização intra-abdominal do carcinoma do ovário. Abordando cada uma das fases deste comportamento de forma individual, pretende-se reunir e explicitar o modo como a expressão desta molécula evolui e afeta a dinâmica tumoral e celular, desde o desenvolvimento neoplásico primário à ancoragem celular numa localização peritoneal secundária. Adicionalmente, pretende-se elucidar o seu contributo para o microambiente tumoral e o seu papel na interação celular do carcinoma do ovárico com este microambiente. Esta sistematização permitirá o conflito e

complementação entre diferentes literaturas e culminará numa visão geral, atual e encadeada deste tema, expondo as necessidades de investigação do mesmo e permitindo a criação e exploração de novas hipóteses e ideias, capazes de conduzir a uma melhor compreensão da evolução natural deste tumor e a novas estratégias terapêuticas e de prevenção do processo de metastização.

## **Materiais e Métodos**

Para a elaboração deste artigo foi realizada uma pesquisa nas bases de dados PubMed e ClinicalKey, entre Março e Setembro de 2017, recorrendo principalmente às palavras-chave “*ovarian cancer*”, “*peritoneal metastasis*”, “*E-cadherin*” e “*adesion molecule*” selecionando artigos de revisão ou investigação, escritos em língua inglesa, publicados entre os anos de 2007 e 2017. Adicionalmente, alguns artigos foram obtidos a partir das sugestões dos próprios motores de busca. Posteriormente foram recuperados e analisados os artigos relevantes para o tema deste trabalho, bem como as referências mais pertinentes dos mesmos.

Muitos foram os artigos encontrados que relacionavam a expressão de E-caderina com outros compostos, moléculas ou vias de sinalização. Destes foram apenas selecionados aqueles que permitem um melhor entendimento da função desta molécula ou tenham maior relevância para o cumprimento dos objetivos desta revisão, tendo sido omitidos os restantes.

A estrutura do trabalho foi delineada com base em seis artigos de revisão, que contribuíram para construir uma ideia mais geral da função da E-caderina. Estes estudos tiveram também em consideração a recuperação de alguma informação de origem anterior a 2007 e que se mostrou essencial à compreensão da evolução da E-caderina ao longo das diferentes fases tumorais e da perspetiva mais atual do funcionamento da molécula.

A divisão do trabalho incide sobre o comportamento da E-caderina durante as fases distintas e fundamentais do processo de metastização intra-abdominal do cancro do ovário. Para além de uma revisão bibliográfica relacionada com esta temática, este trabalho objetivou também a separação ordenada da informação obtida, delineando um percurso evolutivo da expressão e função da E-caderina, em consonância com a cronologia do desenvolvimento tumoral.

Assim, na primeira secção, o trabalho começa por expor o modo como, atualmente, se compreende a evolução dos níveis de E-caderina ao longo do desenvolvimento tumoral,

evidenciando a sua contribuição para a carcinogénese, mas também como a molécula é influenciada pelo microambiente tumoral. Nas 3 secções sucessivas, é abordado o papel da molécula ao longo das diversas fases de metastização intra-abdominal do cancro ovárico, iniciando-se pela fase de desagregação do tumor primitivo e progressão para a formação dos esferoides, terminando com a secção dedicada à adesão mesotelial das células tumorais em suspensão.

## **Expressão e Função da E-caderina no Tumor Primário**

O epitélio superficial do ovário (ESO) é composto por células epiteliais do tipo mesotelial, com capacidade de diferenciação noutros tipos celulares, como resposta a diferentes estímulos do microambiente. São células não completamente diferenciadas que expressam características fenotípicas tanto epiteliais como mesenquimais, algumas das quais comuns também ao mesotélio peritoneal (7). A manutenção da integridade deste epitélio advém da expressão de moléculas de adesão intercelulares, como é o caso da E-caderina. Adicionalmente, a expressão desta molécula apresenta-se também como um fator de relevo na diferenciação do ESO. Alguns estudos evidenciam que a expressão da E-caderina dota as células de características epiteliais, através da expressão de outras moléculas de adesão, da agregação entre células e aquisição de polaridade pelas mesmas (7,20).

Assim, no que respeita ao carcinoma do ovário, em tempos foi considerado que o aumento da expressão de E-caderina estaria associada a um efeito supressor tumoral, enquanto a sua sub-expressão seria um fator promotor da baixa diferenciação e desagregação celular, associada a maior propensão ao desenvolvimento tumoral e maior capacidade invasiva das células (7,20).

Contudo, no ESO normal as junções intercelulares são exclusivamente mantidas pela E-caderina (11), não estando ainda demonstrada uma expressão uniforme de E-caderina (21). Além disso, o processo oposto ao anteriormente descrito por Ahmed e col. e a aquisição de um fenótipo mesenquimal (a designada transição epitelial – mesenquimal, associada a uma diminuição dos níveis de E-caderina, aumento dos níveis de N-caderina e, conseqüentemente, um estado de baixa diferenciação), parece ter um papel fisiológico na reparação do tecido ovárico após a ovulação. Pressupõe-se que impeça a retenção e agregação de células nos quistos de inclusão do estroma ovárico, localização comum do início da transformação neoplásica, nas neoplasias com origem primária no ESO ou, então, promova a sua libertação do interior dos

mesmos. Deste modo, existem fortes evidências que indicam que as células que, por oposição, têm sobreexpressão de E-caderina e fenótipo epitelial (estado de maior diferenciação) e que ficam retidas no interior desses quistos, constituem as que têm maior capacidade de transformação (7,22,23), o que vem contrariar, de certa forma, a ideia mais ou menos consolidada e estabelecida do papel supressor tumoral da E-caderina nos restantes tumores sólidos. Atualmente, considera-se mesmo que a co-expressão de E-caderina com N-caderina no ESO corresponde a um fenómeno de metaplasia, tendo os tumores ováricos primários uma multiplicidade de heterogeneidade fenotípica, com diferentes proporções de caderinas E e N, constituindo, desta forma, uma população celular com significativa heterogeneidade tumoral (11).

Adicionalmente, estudos imuno-histoquímicos mais recentes e alargados de carcinomas ováricos mostraram que a expressão de E-caderina se mantinha em lesões metastáticas e em células tumorais em suspensão no líquido peritoneal, tendo-se concluído que a E-caderina, era a caderina mais prevalente nos esferoides. A sua presença em estádios mais avançados da progressão tumoral torna evidente a sua significativa influência no desenvolvimento e sobrevivência tumoral (4,7). Assim, apesar de ter sido descrita para vários carcinomas a relação inversa entre a E-caderina e a capacidade de invasão e agressividade tumoral (13,20), a dúvida impõe-se no que respeita a esta relação quando se trata do carcinoma do ovário. Da mesma forma, já vários estudos tinham evidenciado que, em alguns tumores, a E-caderina poderia mesmo promover e potenciar a metastização (17).

Desta forma, a E-caderina parece ter um papel inicialmente promotor da carcinogénese (20). Legitimando a explicação desta promoção existe a evidência do efeito mitogénico do estabelecimento de junções aderentes. A ligação entre moléculas de E-caderina conduz à inativação do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), por alteração da região de ligação do seu ligando, o fator de crescimento epidérmico (EGF). Deste modo, fica impedida a

estimulação do crescimento celular causada pelo EGF (4,24). Por outro lado, ao estabelecerem ligações intercelulares, as moléculas de E-caderina promovem uma sobreativação do EGFR, independente da existência de ligandos, com consequente ativação da MAP cinase (MAPK) e a PKB (proteína cinase B) (4,25). Um exemplo desta ativação é a cascata de sinalização do PI3K/PKB, promotora da proliferação celular nas neoplasias epiteliais do ovário (4,20). Outra via de sinalização, também ativada pela criação de junções aderentes e com a mesma função da anterior, em várias células de carcinoma ovárico, é a via do MEK/ERK (26).

Todavia, os níveis de E-caderina em carcinomas mais avançados e indiferenciados tornam-se achados mais inconstantes, quer pela ausência (rara) como pela persistência da molécula, apesar de nestes tumores em estádios mais avançados ser frequente a detecção de baixos níveis de E-caderina. Desta forma, parece estar demonstrado que existe uma relação entre a baixa expressão desta molécula e o desenvolvimento de fenótipos tumorais mais invasivos mas, paradoxalmente, a E-caderina terá uma participação ativa no processo de metastização, dada a manutenção da sua expressão (20).

### **Influência do Microambiente Tumoral na Expressão da E-caderina**

Sabe-se, atualmente, que a subexpressão da E-caderina é influenciada de forma importante pelo microambiente tumoral, estando já estabelecida a sua relação com os níveis de oxigenação celular (7). Tem sido demonstrado que no cancro do ovário ocorre um aumento de fatores de transcrição supressores da expressão da E-caderina, como é o caso do Slug e Snail (7,27). O Snail parece ser um regulador chave da expressão da E-caderina, estando a sua sobreexpressão nuclear correlacionada com a baixa expressão desta molécula, resultando na transição para um fenótipo mesenquimal que, por sua vez, vai induzir uma maior capacidade de disseminação (27). A ativação do Snail parece ser favorecida por mecanismos de hipoxia, o que corrobora a evidente importância do microambiente tumoral na progressão do carcinoma

do ovário (7). Poderá, então, ser estabelecida a hipótese de o crescimento tumoral rápido e as altas necessidades metabólicas das neoplasias ováricas estarem na origem de um microambiente tumoral hipóxico, típico da maioria dos tumores sólidos (16), responsável pela diminuição da expressão de E-caderina.

Tal como o Slug e o Snail, também o Twist parece promover a subexpressão da E-caderina e a progressão tumoral (28). Este fator de transcrição encontra-se ativo e com expressão aumentada em células de carcinoma ovárico com deleções homozigóticas num dos genes supressores da metastização tumoral, o MKK4 (29,30).

Atualmente tem sido atribuído um papel determinante à hipoxia no desenvolvimento dos tumores malignos em geral e do carcinoma do ovário em particular, além de outras vias moleculares poderem correlacionar este fenómeno com a subexpressão de E-caderina. Segundo Wang e col., o estado de hipoxia crónica do tumor primário promove a produção de espécies reativas de oxigénio, que ativam o Fator Induzível por Hipoxia 1-alfa (HIF1- $\alpha$ ) e vias moleculares subsequentes, estando a ativação reversível deste fator associada a uma menor expressão do mRNA e da proteína da E-caderina. O mesmo estudo propõe que seja a ativação da Lisil Oxidase (LOX), diretamente subsequente à ativação do HIF1- $\alpha$ , que esteja implicada na regulação da expressão de E-caderina; na verdade, apesar de esta relação estar documentada, não foi provada para o carcinoma ovárico (16). Atualmente existem também evidências de que o HIF1- $\alpha$  possa ser um regulador positivo da expressão do Snail, propondo a existência de uma via HIF1- $\alpha$  – Snail – E-caderina com um papel de relevo no desenvolvimento do tumor epitelial do ovário (31,32).

Apesar de não estar bem estabelecido o modo como todos estes fatores influenciam a expressão genética da molécula, já existem indícios que apontam para a metilação como um elemento chave da regulação da expressão génica da E-caderina e um dos principais mecanismos para a diminuição dos seus níveis (33,34). Na verdade, a modificação epigenética



de vários genes associados à progressão tumoral do carcinoma ovárico, incluindo a própria subexpressão de E-caderina, tem sido relacionada com a atividade da G9a, uma histona metiltransferase (35).

De modo distinto, outros estudos encontraram elevadas concentrações de E-caderina solúvel no líquido cístico de carcinomas ováricos, pressupondo que também uma atividade proteolítica sobre esta molécula cause diminuição dos seus níveis e o aparecimento do referido fenótipo mais agressivo (1,7). Estudos biomoleculares mais recentes mostram que, efetivamente, a E-caderina é processada por várias proteases do microambiente tumoral, podendo originar fragmentos moleculares de várias dimensões (6). A título de exemplo, vejamos a clivagem proteolítica do componente extracelular da E-caderina, e que é responsável pela perda da sua expressão. Isto ocorre por ação de  $\alpha$ -secretases, com a coparticipação de outras enzimas, como diversas metaloproteinases (MMPs) (17), habitualmente expressas em diversos carcinomas (36). Tal afirmação é corroborada pelos achados de uma molécula solúvel de E-caderina (sE-caderina) de 80 KDa no soro e líquido peritoneal de pacientes com carcinoma do ovário, bem como no líquido cístico das massas ováricas, estando em todos os casos associada a tumores complexos e de mau prognóstico (4,20). Adicionalmente, vários estudos têm evidenciado níveis elevados de MMPs no líquido ascítico de doentes com carcinoma do ovário (20), que estando, deste modo, em contacto permanente com o tumor, fazem parte do seu microambiente tumoral. Ou seja, a diminuição dos níveis de E-caderina pode dever-se a um mecanismo de proteólise ou à regulação da sua expressão, mas este decréscimo parece estar relacionado com a aquisição de potencial invasivo por parte das neoplasias epiteliais do ovário e dependente da composição do microambiente tumoral.

Deste modo, considerações anteriormente sólidas e até ao momento bem estabelecidas respeitantes à relação direta entre E-caderina e supressão tumoral e relação inversa entre E-caderina e a capacidade de invasão do cancro ovárico começam a ser questionadas e, de certa

forma, contrariadas. Esta molécula parece ter um papel mais complexo e paradoxal, em determinadas circunstâncias. A sua função não é ditada pela simples expressão ou ausência, mas pela intermitência entre diversos estados de expressão durante os vários momentos do processo de desenvolvimento e metastização tumoral, bem como pelas vias celulares em que participa. Contudo, não podemos ignorar a perspectiva destas teorias mais primordiais, principalmente no que respeita à sua correlação com os aspetos clínicos do carcinoma do ovário: a baixa expressão de E-caderina parece correlacionar-se com tumores mais indiferenciados e com pior prognóstico (16). Os níveis de E-caderina têm assim uma potencial aplicação prática como preditores prognósticos (37). Foi evidenciado que os baixos níveis de E-caderina se correlacionam com estádios mais avançados, indiferenciação celular e recorrência tumoral (37,38). Ou seja, a expressão negativa da molécula por células de cancro do ovário é indicativa de baixa sobrevida (25,37), sendo que o oposto também é confirmado pela maioria dos estudos, ou seja a sobreexpressão desta molécula parece estar correlacionada com um melhor prognóstico (39).

## **Desagregação Tumoral e Formação da Efusão Celular Maligna**

Wu e col. reportam, em 2008, que em culturas de camada única de células de carcinoma ovárico, o estabelecimento de junções aderentes obrigava as células a agruparem-se e impedia a migração celular (22). Estas evidências provam que as junções aderentes interferem na capacidade migratória das células tumorais e que, conseqüentemente, as caderinas influenciam o processo de libertação de células tumorais do tumor principal para o líquido peritoneal, processo esse que adquire um papel central na fisiopatologia do carcinoma ovárico.

Como previamente explicitado, em tumores mais avançados ocorre perda de E-caderina por clivagem do seu domínio extracelular pela ação das metaloproteinases. Está estabelecido que existem níveis elevados de MMP-9 extracelular em tumores ováricos malignos e que, independentemente da sua origem intra ou extracelular, ela se torna um componente *in vivo* do microambiente tumoral, que cataboliza de forma efetiva o domínio extracelular da E-caderina (36). Esta clivagem leva a desintegração das junções aderentes e, conseqüentemente, à disjunção das células tumorais, com a aquisição de um fenótipo mesenquimal e ganho de capacidade migratória. Este papel da MMP-9 na aquisição de um fenótipo mesenquimal foi estabelecido em células do epitélio mamário murino e num modelo de cataratas em ratos. A ação desta protease pode também explicar como os elevados níveis de MMP-9 nos tecidos de carcinoma ovárico e respetivo líquido ascítico se correlacionam com a recorrência da doença e baixas taxas de sobrevivência (36). Com a descoberta de níveis elevados, tanto de MMP-9 como de sE-caderina, na ascite de doentes com carcinoma do ovárico, existe um muito provável contributo da primeira molécula para os níveis encontrados da segunda (40).

A sE-caderina é uma forma solúvel da E-caderina, que evidenciou possuir, por si só, atividade biológica. Isto porque o tratamento de células de carcinoma ovárico com uma forma recombinante da mesma diminuiu a adesão intercelular e alterou a morfologia das células, que adquiriram um fenótipo mais próximo do mesenquimal. Adicionalmente, esta experiência

demonstrou também uma maior dispersão das células tumorais, o que corrobora a ideia de uma desagregação seguida de disseminação de células do tumor primário para o líquido peritoneal (4). Assim, os mesmos mecanismos de alteração da dinâmica celular que influenciam a adesividade intercelular têm um papel crítico no início do processo de metastático do carcinoma ovárico, permitindo a libertação das células do tumor primário e a sua consequente movimentação livre pelo líquido peritoneal e consequentemente propagação intra-abdominal (20).

Desta forma, a possibilidade de um microambiente rico em sE-caderina, condicionado *in vivo* pela presença da molécula no líquido peritoneal, que envolve o tumor primário e a própria efusão celular peritoneal, adquire a maior importância não só na manutenção do processo de dispersão celular no tumor primário, mas também na desagregação dos esferoides em suspensão no líquido peritoneal. Por sua vez, este último processo é essencial no estabelecimento da posterior ancoragem das células tumorais metastáticas ao peritônio (20,36). Assim, explica-se também a abundância destas moléculas no líquido peritoneal de doentes com neoplasias epiteliais malignas do ovário e tumores *borderline* e a sua relação com um prognóstico mais reservado e taxas de sobrevivência mais baixas (36,40).

Deste modo, está já estabelecido que várias enzimas podem clivar a E-caderina e que a implementação extracelular deste processo culmina na desagregação intercelular. A Calpaina não é exceção. Neste caso, trata-se de uma protease intracelular cuja expressão se correlaciona com o aparecimento de dois fragmentos de E-caderina, um de 85 kDa (E-cad-85) e outro de 23 kDa (E-cad-23). Os tumores ováricos com metastização exclusivamente intraperitoneal possuem elevados níveis de fragmentos de E-caderina, não sendo estes dois exceção, o que parece indicar uma elevada atividade da Calpaina nestes tumores. Ao ser clivada em E-cad-85, a E-caderina perde a sua capacidade de adesão à proteína  $\beta$ -Catenina, responsável pela ligação intracelular ao citoesqueleto. Desta forma, a expressão da Calpaina no tumor epitelial do ovário

parece destabilizar a configuração celular e, conseqüentemente, o contacto intercelular promovendo, tal como a sE-caderina, a disseminação intraperitoneal (13).

Também, como já referido, a perda de E-caderina dá-se por mecanismos de subexpressão genética, quer associados a reguladores negativos (como o Slug, o Snail e Twist), quer dependentes do microambiente tumoral, mais propriamente do estado de hipoxia e, conseqüentemente, da produção de ROS, culminando na ativação do HIF1- $\alpha$ , ou uma associação de ambos os mecanismos.

Wang e col., em 2014, mostraram também que utilizando a Emodina para aumentar excessivamente a produção de ROS em células de carcinoma ovárico *in vitro*, não só reprimiu a expressão da E-caderina, como aumentou a capacidade migratória das células (16). O HIF1- $\alpha$  também promove a expressão do AEG-1 (Astrocyte elevated gene-1), que se revelou ser potenciador do fenótipo mesenquimal, uma vez que aumenta a expressão de metaloproteinases como a MMP-9 e inibe a expressão da E-caderina (41). Adicionalmente, a expressão de ambos os fatores, HIF1- $\alpha$  e AEG-1, relacionados com a hipoxia, mostrou estar relacionada com uma maior capacidade de migração das células do cancro do ovário (41).

Por outro lado, a estimulação de reguladores negativos da E-caderina não depende somente do estado de hipoxia nem da constituição genética tumoral. A presença de ligandos activadores do EGFR no microambiente tumoral, bem como de um potenciador da ativação de vias moleculares dependentes desse mesmo recetor que está sobreexpresso no carcinoma ovárico, o designado HER2, estão envolvidos na supressão da expressão de E-caderina. Este efeito está também na dependência do Snail e Slug, contudo são ligandos do EGFR, como o EGF e o AREG, que o desencadeiam (42,43). Esta ativação conjunta do EGFR e HER2 evidenciou uma relação direta com a agressividade e capacidade de invasão e metastização do cancro ovárico (43).

A subexpressão da molécula ocorre também devido à sua perda de função, com a destruição das junções aderentes. Isto leva a  $\beta$ -catenina (que está ligada à E-caderina) a ser libertada e a penetrar no núcleo da célula, ativando a via de sinalização do Wnt/ $\beta$ -catenina. O resultado final é um processo de retrocontrolo positivo, uma vez que esta via culmina na inibição da transcrição do gene que codifica para a E-caderina (17).

Outras moléculas estão muito provavelmente envolvidas nos processos sub-celulares de metastização intra-abdominal do carcinoma ovárico, através da interação direta com expressão da E-caderina. Essas moléculas são os micro RNAs (miR), que regulam a expressão genética ao nível pós-transcricional. A atividade do miR-200 mostrou contribuir para a evicção do potencial metastático do tumor, através da regulação da expressão dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2 (30,44,45), estando os seus níveis elevados quando as células sofrem transformação epitelial e reduzidos quando o carcinoma do ovário sofre progressão para um estado mais invasivo (45). O aumento dos níveis de ZEB1 mostrou potenciar a metastização tumoral, na medida em que inibe a expressão do miR-200 e, simultaneamente, da E-caderina (30,44). Também o miR-145, de um modo semelhante, promove a sobrerregulação da E-caderina, enquanto inibe o MUC1, molécula que, por sua vez, reprime a expressão da E-caderina (46). Por outro lado, o miR-9, com ação direta sobre o mRNA da E-caderina, tem um efeito final supressor da produção dessa mesma molécula, contribuindo para a formação da efusão de células de cancro ovárico (47). Apesar de não constituírem um contributo imprescindível para a compreensão da função da E-caderina, estas moléculas podem conduzir à melhor e mais abrangente compreensão dos mecanismos de regulação da expressão da molécula e, simultaneamente, constituir eventuais alvos terapêuticos para a inibição da fase inicial do processo de metastização em estudo. Adicionalmente, foi recentemente reportado que o miR-506 tem um papel múltiplo na supressão da aquisição de um fenótipo mesenquimal por parte das células do carcinoma ovárico primário, incluindo a sobreexpressão de E-caderina, e,

assim, também uma ação preventiva da metastização, muito interessante do ponto de vista terapêutico (48,49).

Estabelece-se, desta forma, que a transição epitelial-mesenquimal, com perda de E-caderina, tem um papel de relevo na disseminação intraperitoneal do carcinoma ovárico. Está, inclusive, bem descrito que a detecção de positividade de E-caderina diminui de tumores em estágio I/II para tumores em estágio III/IV (25); contudo, nas fases subsequentes da metastização, também o estabelecimento de ligações intercelulares e a expressão de E-caderina e de um fenótipo epitelial constituem importantes acontecimentos (20), tal como apresentado de seguida.

## **Agregados Multicelulares como Mecanismo de Sobrevivência e Resistência**

As células que são libertadas da localização tumoral primária estão associadas ao aparecimento de ascite nas doentes com cancro ovárico. A colheita e análise deste líquido ascítico evidencia a existência de células individuais e outras unidas sob a forma de esferoides (12): agregados multicelulares (MCAs) de 30-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro e que permitem o crescimento e sobrevivência celular, não dependente da ancoragem ao meio extracelular (20). As células individuais, desprovidas de suporte pela matriz extracelular, tornam-se suscetíveis aos mecanismos de anoiquia e apoptose, o que explica a necessidade da existência destes MCAs (20). A formação destes, dada a ausência de matéria de suporte, parece estar dependente da adesão intercelular e, mais concretamente, da função adesiva da E-caderina.

Já tinha sido demonstrado que expressão da E-caderina em linhagens celulares de células de cancro da mama poderia ser essencial à adesão e/ou compactação dos esferoides (12). Porém, estudos realizados utilizando um mutante dominante negativo desta molécula, mostraram que a interferência na função normal da mesma provocava uma disrupção das junções aderentes e prevenia a formação de esferoides com células de carcinoma ovárico (20). Adicionalmente, está também descrito um papel de manutenção da morfologia dos esferoides para a E-caderina (50). Todas estas evidências parecem corroborar a existência de um contributo positivo da molécula na formação dos MCAs.

Para testar a veracidade destes dados, Xu e col. estabeleceram um modelo tridimensional de MCAs em suspensão com células de carcinoma do ovário. Os seus resultados evidenciaram que células com níveis elevados de E-caderina estavam muito mais compactadas, organizadas em esferoides intactos e com tempos de sobrevivência superiores aos grupos celulares com níveis baixos de E-caderina ou, mesmo, ausência desta molécula. O estudo demonstrou que, nessas mesmas células, o bloqueio da função da E-caderina culminava na



dissociação dos esferoides, com as células em suspensão a desprenderem-se gradualmente dos mesmos e a perder volume celular (19).

Apesar de não se verificar, tal como no tumor primário com níveis baixos de E-caderina, uma relação inversa entre a molécula e os reguladores negativos da sua expressão, como o Slug ou o Snail, Elloul e col. evidenciaram a existência da sua relação com a Pak 1. Nos tumores sólidos a sobreexpressão desta molécula potencia a ação inibitória do Snail ao promover a sua acumulação nuclear. Contudo as células de carcinoma ovárico em efusão mostraram baixos níveis de Pak 1, suscitando um possível papel desta molécula num reaparecimento da expressão de E-caderina nos esferoides (50).

Ainda sobre este tópico, existe a hipótese de que não seja a molécula integral a responsável pelos fenómenos de agregação em MCAs, mas sim os seus fragmentos, como o E-cad-85. Na verdade, um estudo evidenciou que, numa linhagem celular de cancro da mama, os fragmentos de E-caderina de 100 kDa formados pela Calpaina se encontravam distribuídos multidirecionalmente por toda a superfície celular tumoral, não estando confinados às junções aderentes (51). Esta distribuição permite a formação multidirecional de agregados de células tumorais e, portanto, de esferoides com positividade para a E-caderina. Assim, cria-se a hipótese de que de forma semelhante, no carcinoma do ovário, fragmentos como o E-cad-85 possam ter uma ação semelhante aos fragmentos de 100 kDa do carcinoma da mama, porque esta molécula mantém o seu domínio extracelular (contrariamente ao sE-caderina, dado que a Calpaina que a forma é exclusivamente intracelular) (13).

A manutenção da expressão de E-caderina nas células em suspensão e MCAs está já devidamente estabelecida, apesar de existirem alguns dados contraditórios revelando quer aumentos, quer diminuições da sua quantidade em células em efusão, quando comparados com o tumor sólido (52). Desta forma, parece estar explicado o facto da diminuição da quantidade de E-caderina íntegra permitir a eventual formação de esferoides, na medida em que a sua

fragmentação por proteólise pode ter um papel de relevo nesta função. Todavia, também como já foi referido, mesmo que não se verifique um aumento da expressão da molécula, não existe um desaparecimento completo da mesma na maioria dos casos, o que pode indicar a possibilidade de esta possuir outras funções suplementares.

A inibição da E-caderina mostrou sensibilizar as células tumorais para a quimioterapia, deteriorando a “resistência multicelular”; de facto, a agregação de múltiplas células em esferoides promove a sua resistência a agentes de quimioterapia, independentemente dos níveis de E-caderina (19,20). Assim, a presença de E-caderina parece aumentar o grau de quimiorresistência à já conferida pela disposição natural das células sob a forma de MCAs. Está mesmo documentado que as junções aderentes, em suspensões de esferoides de células tumorais do cólon HT29, causam a dessensibilização dessas mesmas células à ação de drogas citotóxicas, e que células de carcinoma ovárico sob a forma de esferoides em suspensão que expressam elevados níveis de E-caderina têm uma menor mortalidade após tratamento com cisplatina, do que aquelas com níveis baixos ou ausência da molécula. Permanece ainda por elucidar o mecanismo pelo qual a E-caderina confere esta quimiorresistência. (19)

Tal como referido no início deste trabalho, a E-caderina ativa vias estimuladoras da proliferação celular pela via do EGFR independente do ligando, evidência esta que Hudson, em 2008, considerou ser uma justificação de como a E-caderina dota os esferoides de capacidade de crescimento não dependente da ancoragem a um meio extracelular (20). Todavia, a investigação de Xu e col., em 2014, demonstrou que, independentemente dos níveis de expressão de E-caderina, o crescimento celular nos MCAs se manteve relativamente estabilizado ao longo do tempo. Estes achados são considerados pelo autor como uma evidência de que a molécula aumenta a agregação e adesão celular podendo, neste sentido, permitir o crescimento por agrupamento celular, mas não a proliferação das células em suspensão (19).

Apesar de estar provado que a agregação em MCAs de carcinoma do ovário confere resistência celular a processos de anoiquia (19) e que a E-caderina tem um papel importante na formação desses agregados, não podemos, contudo, inferir que a expressão dessa molécula aumente diretamente a resistência a processos de anoiquia. Isto deve-se ao facto de a relação entre as caderinas e este processo ser dependente do tipo celular em causa: a molécula aumenta o processo de anoiquia nas células de Sarcoma de Ewing mas, por outro lado, aumenta a resistência ao processo em células do epitélio mamário (52). Porém, existem evidências de que a via de sinalização MEK/ERK promove a resistência das células neoplásicas do carcinoma do ovário aos mecanismos de anoiquia sendo, como já vimos, a sua ativação possível por ação da E-caderina. Estas evidências sugerem o envolvimento direto da molécula também nesse processo de resistência (26), porém não o confirmam.

Desta forma podemos concluir que a diminuição da expressão e a alteração da integridade da E-caderina contribui para a desagregação celular no tumor primário e a sua disseminação peritoneal. Contudo, a molécula não tende a ser completamente eliminada do fenótipo das células de carcinoma do ovário em suspensão no peritoneu. O oposto, isto é a sua expressão, contribui para a agregação celular e formação de esferoides, bem como para a sua manutenção e resistência a drogas. Parece existir, adicionalmente, uma contribuição da molécula na resistência a processos de morte celular por anoiquia. Deste modo, a relação da E-caderina com a disseminação peritoneal, sobrevivência celular e resistência a fármacos prova, desde logo, o seu potencial interesse enquanto alvo molecular no tratamento do cancro do ovário.

## **Heterogeneidade dos Esferoides na Adesão Mesotelial**

Os esferoides têm um papel basilar no processo de metastização intraperitoneal do carcinoma ovárico. É atualmente aceite que possuem competência na desagregação e adesão ao mesotélio peritoneal, bem como à matriz extracelular submesotelial, aquando do contacto com estas estruturas, permitindo a evolução do cancro do ovário para estádios avançados de disseminação e doença metastática. Todavia, descobriu-se que a maioria dos MCAs com esta adesividade possui fraca capacidade invasiva, o que levou os investigadores a concluir acerca da existência de uma heterogeneidade do potencial de invasividade dos esferoides (11,53).

Estas diferenças fenotípicas também se estendem às moléculas de adesão. Em primeiro lugar, facilmente se compreende como o carcinoma ovárico primário, com heterogeneidade celular em termos da expressão de caderinas, liberta várias unidades celulares igualmente com expressão distinta de E-caderina. Em segundo lugar, apesar de ser aceite de forma generalizada que células com capacidade de adesão semelhante - ou seja, semelhante padrão de expressão de caderinas - tendem a agrupar-se num processo de adesão seletiva, novos dados apontam para a existência de esferoides com complexos adesivos heterodiméricos contendo a E-caderina e a N-caderina(11,53). Do mesmo modo, também vários estudos evidenciaram que, para alguns tumores, a manutenção simultânea da capacidade de invasão e de um fenótipo E-caderina positivo se correlacionava com a co-expressão de outras caderinas, como a N-caderina (17).

De acordo com estas evidências, Klymenko e col. concluíram, em 2017, que as ligações intercelulares mediadas por E-caderina são mais fortes comparativamente com as mediadas pela N-caderina, e que células com um fenótipo mais epitelial (elevada expressão de E-caderina) têm uma forma mais esférica. Assim, a E-caderina torna muito mais difícil a desagregação dos esferoides, essencial à adesão mesotelial, bem como dota as células de uma conformação tridimensional que limita as zonas de contacto entre as células tumorais e o mesotélio a uma superfície muito mais reduzida. Estes dados, parecem sugerir que, enquanto os níveis elevados

de E-caderina constituem uma vantagem para os esferoides livres na cavidade peritoneal, a sobreexpressão desta molécula relaciona-se com uma capacidade adesiva ao mesotélio e matriz submesotelial mais atenuada (11).

Toda a intermitência, largamente evidenciada, da expressão de E-caderina torna-se mais complexa quando novos dados sugerem que a adesão de células do carcinoma do ovário ao estroma submesotelial peritoneal ativa o EGFR, ativação essa que resulta no estímulo mitogénico e na sobreexpressão de metaloproteinases (mais propriamente a MMP-9) responsáveis pela degradação de E-caderina. Cria-se assim um mecanismo que diminui os níveis de E-caderina, mas simultaneamente é capaz de promover a proliferação e/ou a invasão tumoral por manutenção da ativação do EGFR (4,36,54). Ou seja, contrariamente ao que acontece no tumor primário, em que a E-caderina é promotora de processos mitóticos, sobreativando o EGFR, nas localizações secundárias a molécula parece ser subregulada e outras moléculas mantêm a ativação desse recetor e o estímulo proliferativo. Adicionalmente, podem existir outras fontes ou vias de regulação que também explicam a origem das MMP-9 (54).

Como já mencionado, a relação da E-caderina com o EGFR é complexa, uma vez que ela sobreativa o recetor mas modifica-o, impedindo que outros ligandos o façam. Assim, no que respeita à adesão mesotelial, um estudo mostrou que a E-caderina regula a  $\alpha 5$ -integrina através de uma via de sinalização dependente do EGFR/FAK/Erk1(24). Estas evidências propõem que seja a diminuição dos níveis de E-caderina que, ao deixar de exercer a tal inibição da ação dos ligandos sobre o EGFR, permite que o EGF (na sua condição de ligando) atue no EGFR e regule a  $\alpha 5$ -integrina através da via da MAPK. Esse mesmo estudo, evidencia que com a perda de E-caderina ocorre, assim, uma sobrerregulação da  $\alpha 5$ -integrina, que dota as células de capacidade adesiva à matriz extracelular do mesotélio peritoneal (6,20,24), estando essa sobreexpressão relacionada com uma menor sobrevivência das doentes (24).

Enquanto carcinomas ováricos não metastizados exibem expressão membranar de E-caderina, os tumores já metastizados parecem não necessitar da expressão ou função da molécula após o processo de ancoragem a locais secundários (11). Esta afirmação correlaciona-se com dados já apresentados e com outros que mostram uma ausência de expressão ou expressão meramente citoplasmática de E-caderina nas formações metastáticas do cancro do ovário. Enquanto a ausência de expressão da molécula se pode dever a um silenciamento epigenético ou a uma taxa de clivagem superior à reposição, a expressão citoplasmática da mesma pode ser explicada por defeitos de transporte membranar ou uma fagocitose exacerbada (36).

## Conclusão

O cancro do ovário de origem epitelial possui um padrão metastático único, preferencialmente intra-abdominal, que juntamente com os tumores secundários peritoneais somente invasivos na superfície, constituem características de prognóstico mais favorável para estas neoplasias. Todavia outros fatores como o diagnóstico tardio, a quimiossensibilidade de curta duração e de fácil resistência, associadas à comum recorrência deste carcinoma, são responsáveis pelo seu prognóstico sombrio (6).

Apesar de a E-caderina estar bem caracterizada e estabelecida como uma molécula de supressão tumoral na maioria dos tumores sólidos, atualmente reconhece-se um papel importante da mesma no desenvolvimento e evolução do tumor ovário. Esta molécula é reconhecida por vários estudos como um marcador de metaplasia do epitélio ovário (22,23), bem como um potenciador da capacidade mitótica das células neoplásicas (4). Contudo, reconhece-se a diminuição da sua expressão como o acontecimento mais relevante na disseminação tumoral do carcinoma ovário. Esta ocorre em consequência de mecanismos de alteração epigenética e fenotípica, por sua vez em grande dependência da composição molecular do microambiente tumoral (20).

Múltiplas moléculas geradas nesse meio extracelular, quer resultantes de um ambiente hipóxico (16), por exemplo, quer de uma expressão genética tumoral elevada, como por ação das metaloproteinases (20), contribuem para a diminuição da expressão de E-caderina. Existem múltiplas evidências que comprovam a associação de vários componentes moleculares do ambiente intracelular e extracelular do tumor ovário com os baixos níveis desta molécula, mas também com a aquisição de um fenótipo mais agressivo, associado a maior capacidade de disseminação do tumor e a piores prognósticos (13,16,20,27,36,44). Estes dados vêm confirmar o papel fulcral da transição epitelial-mesenquimal, que ocorre com a destruição das junções

aderentes e perda de E-caderina, na desagregação celular na massa tumoral primária e na formação de uma suspensão celular peritoneal.

Apesar da expressão de E-caderina estar diminuída em carcinomas ováricos mais avançados e da sua baixa expressão ser indicativa de pior prognóstico, a relação entre a expressão de E-caderina e a capacidade de invasão tumoral não é, contudo, linear. A diminuição dos níveis desta molécula tem um papel fulcral na disseminação do tumor; porém, a manutenção da expressão da mesma considera-se também essencial ao processo de metastização. É devido à função desta molécula, ou de parte da mesma, que as células desagregadas do tumor primário são capazes de se agrupar em esferoides e, conseqüentemente, sobreviver em suspensão no líquido peritoneal (13,19). Contudo, a posterior adesão mesotelial requer a dissociação destes agregados e a quebra de junções intercelulares. A co-expressão de N-caderina e a diminuição dos níveis de E-caderina tornam-se, deste modo, fulcrais para a instituição de um fenótipo invasivo e possibilitam a adesão ao mesotélio e o estabelecimento de metástases intraperitoneais do carcinoma ovárico (11,17).

Adicionalmente, tal como documentado por Xu e col. (19), a E-caderina altera a capacidade de sobrevivência da suspensão celular tumoral no líquido peritoneal, influenciando a resistência celular a processos anoiquia. A sobrevivência celular à ação de drogas citotóxicas utilizadas no tratamento de doentes parece aumentar também com a expressão de E-caderina, evidenciando o contributo desta molécula na resistência aos esquemas de quimioterapia, comum nos cancros do ovário.

Pela forma dinâmica como varia a sua expressão e pela forma como afeta a metastização intra-abdominal, a E-caderina, constitui, assim, uma molécula com elevado interesse dada a sua potencial aplicabilidade no diagnóstico e estadiamento, bem como no tratamento do cancro ovárico, respetivamente. Contudo, o modo como ocorrem as variações dos níveis de E-caderina, desde o tumor primário até as células em suspensão, ainda não se encontra completamente



esclarecido. Na verdade, existem duas evidências de grande relevância para o estabelecimento de estratégias terapêuticas associadas à E-caderina: a relação positiva existente entre os baixos níveis desta molécula e a maior agressividade tumoral e, conseqüentemente, pior prognóstico; e o facto de estar provado que a estimulação da sobreexpressão desta caderina possibilita a diminuição da disseminação celular a partir do tumor primário. Contudo, a diminuição da expressão da molécula parece ser também uma possível via terapêutica, dado o contributo da E-caderina para a quimiorresistência e a sobrevivência dos esferoides. Face a estas evidências, é necessário ainda investigar de que forma as alterações nos valores de E-caderina intervêm nas variadas fases do processo de metastização, dada a heterogeneidade de expressões e funções desta molécula ao longo do mesmo.

Adicionalmente, urge a necessidade de melhor compreender quais os mecanismos biomoleculares e as funções das moléculas de adesão que ditam o comportamento do cancro do ovário, escrutinando principalmente as divergências existentes entre o processo de metastização intraperitoneal e vascular, que poderão explicar o seu padrão de disseminação único. Só entendendo como estes mecanismos influenciam a capacidade de metastização desta neoplasia, recorrência e resistência aos agentes de quimioterapia será possível permitir o progresso e aperfeiçoamento das abordagens terapêuticas da doença, principalmente através da prevenção da disseminação tumoral.

Por último, está bem estabelecida a importância do microambiente tumoral e o modo como a sua composição influencia a expressão de várias moléculas, incluindo as caderinas. A alteração deste microambiente pode ser também uma possível via de atuação terapêutica no carcinoma ovárico, sendo várias as moléculas que permitirão a manipulação indireta da expressão da E-caderina. É, todavia, imprescindível que se continue a desvendar a constituição bioquímica deste meio e o modo como os seus vários constituintes interagem entre si e com as células tumorais.

Concluindo, a diminuição da expressão de E-caderina é um dos mecanismos mais importantes para a desagregação celular no tumor primário, que permite o transporte de células a locais distantes no espaço intra-abdominal. Todavia, só com a manutenção de alguma expressão da molécula é que essas mesmas células conseguem agrupar-se em esferoides e sobreviver a mecanismos de morte celular em suspensão, até que se dê a agregação ao local de metastização peritoneal. Neste momento, a recorrência de fenómenos de subexpressão da molécula tornam-se indispensáveis para que as células dos esferoides estejam capacitadas de aderir ao mesotélio peritoneal e formar tumores secundários. O conhecimento destas ações da E-caderina têm uma aplicabilidade prática vasta na prevenção da metastização, na inibição da formação de esferoides, no impedimento da desagregação dos mesmos e adesão à superfície peritoneal. A compreensão destes mecanismos é fundamental à preparação de novos fármacos citostáticos, permitindo a criação de moléculas “inteligentes” e dirigidas, nomeadamente, à E-caderina, já que esta parece ter um papel fundamental nestes mecanismos de disseminação e metastização intraperitoneal.

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Margarida Figueiredo Dias, pela disponibilidade e importante orientação ao longo da realização deste trabalho. Agradeço todo o seu apoio, quer na partilha de conhecimento científico e clínico, quer a nível motivacional.

Aos meus pais, para os quais os agradecimentos transcendem o apoio e confiança em mim depositada, uma vez que são eles os principais responsáveis por toda a formação académica e oportunidades de ensino de que posso usufruir.

À Carolina, não só pela sua função crítica e de correção nas várias fases deste trabalho, mas também por todo o suporte emocional e por ser a pessoa que estimula a minha motivação e me faz aspirar diariamente ao máximo das minhas capacidades.

Aos meus amigos, de curso e de infância, por todos os conselhos, opiniões e ensinamentos, que me ajudaram neste trabalho e ao longo de todo o meu percurso universitário.

Por fim, a todos o que, mesmo não estando identificados individualmente, se mostram sempre disponíveis para apoiar os meus projetos académicos e pessoais.

## Referências Bibliográficas

1. Meinhold-Heerlein I, Hauptmann S. The heterogeneity of ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289(2):237–9.
2. Kurman R, Shih I. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):433–43.
3. Nezhat FR, Apostol R, Nezhat C, Pejovic T. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(3):262–7.
4. Francesca FR, Mezzanzanica D, Rea K, Tomassetti A. Guidance of signaling activations by cadherins and integrins in epithelial ovarian cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
5. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to Know Ovarian Cancer Ascites: Opportunities for Targeted Therapy-Based Translational Research. *Front Oncol.* 2013;3(September):1–13.
6. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1053–64.
7. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial–mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: An exception to the norm. *J Cell Physiol.* 2007 Dec;213(3):581–8.
8. Pradeep S, Kim SW, Wu SY, Nishimura M, Chaluvally-Raghavan P, Miyake T, et al. Hematogenous Metastasis of Ovarian Cancer: Rethinking Mode of Spread. *Cancer Cell.* 2014;26(1):77–91.
9. Coffman LG, Burgos-Ojeda D, Wu R, Cho K, Bai S, Buckanovich RJ. New models of hematogenous ovarian cancer metastasis demonstrate preferential spread to the ovary and a requirement for the ovary for abdominal dissemination. *Transl Res.* 2015;175:92–102.e2.
10. Shinagare AB, O'Neill AC, Cheng S, Somarouthu B, Tirumani SH, Nishino M, et al.

- Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer: Frequency and Timing of Thoracic Metastases and the Implications for Chest Imaging Follow-up. *Radiology*. 2015;277(3):733–40.
11. Klymenko Y, Johnson J, Bos B, Lombard R, Campbell L, Loughran E, et al. Heterogeneous Cadherin Expression and Multicellular Aggregate Dynamics in Ovarian Cancer Dissemination. *Neoplasia*. 2017;19(7):549–63.
  12. Shield K, Ackland ML, Ahmed N, Rice GE. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*. 2009;113(1):143–8.
  13. Trillsch F, Kuerti S, Eulenburg C, Burandt E, Woelber L, Prieske K, et al. E-Cadherin fragments as potential mediators for peritoneal metastasis in advanced epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(2):213–20.
  14. Danolic D, Alvir I, Mamic I, Kostic L, Tomica D, Puljiz M, et al. Cancer of the ovary, fallopian tube and peritoneum: Surgical management. *Libr Oncol*. 2015;43(1–3):41–9.
  15. Coward JI, Middleton K, Murphy F. IJWH-52379-new-perspectives-on-targeted-therapy-in-ovarian-cancer. *Int J Womens Health*. 2015;7:189–203.
  16. Wang Y, Ma J, Shen H, Wang C, Sun Y, Howell SB, et al. Reactive oxygen species promote ovarian cancer progression via the HIF-1 $\alpha$ /LOX/E-cadherin pathway. *Oncol Rep*. 2014;32(5):2150–8.
  17. Hu QP, Kuang JY, Yang QK, Bian XW, Yu SC. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(12):2804–12.
  18. Quattrocchi L, Green AR, Martin S, Durrant L, Deen S. The cadherin switch in ovarian high-grade serous carcinoma is associated with disease progression. *Virchows Arch*. 2011;459(1):21–9.
  19. Xu S, Yang Y, Dong L, Qiu W, Yang L, Wang X, et al. Construction and characteristics of an E-cadherin-related three-dimensional suspension growth model of ovarian cancer.

- Sci Rep. 2014;4:5646.
20. Hudson LG, Zeineldin R, Stack MS. Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: Unique cadherin profiles in tumor progression. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):643–55.
  21. Landen CN, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(6):995–1005.
  22. Wu C, Cipollone J, Maines-Bandiera S, Tan C, Karsan A, Auersperg N, et al. The morphogenic function of E-cadherin-mediated adherens junctions in epithelial ovarian carcinoma formation and progression. *Differentiation*. 2008 Feb;76(2):193–205.
  23. Choi P-W, Yang J, Ng S-K, Feltmate C, Muto MG, Hasselblatt K, et al. Loss of E-cadherin disrupts ovarian epithelial inclusion cyst formation and collective cell movement in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(4):4110–21.
  24. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, et al. Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via  $\alpha 5$  Integrin, which Is a Therapeutic Target. *Cancer Res*. 2008;68(7):2329–39.
  25. Janesari-Ladani F, Hosein G, Monhasery N, Shahoei SH, Izadi Mod N. Wnt5a influences viability, migration, adhesion, colony formation, E- And N-cadherin expression of human ovarian cancer cell line SKOV-3. *Folia Biol (Czech Republic)*. 2014;60(2):57–67.
  26. Dong L, Liu L, Ma C, Li J, Du C, Xu S, et al. E-cadherin promotes proliferation of human ovarian cancer cells in vitro via activating MEK/ERK pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(6):817–22.
  27. Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, et al. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014;7(1):76.

28. Wang W-S, Yu S-L, Yang X-S, Chang S-D, Hou J-Q. Expression and significance of twist and E-cadherin in ovarian cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(2):669–72.
29. Nakayama K, Nakayama N, Katagiri H, Miyazaki K. Mechanisms of ovarian cancer metastasis: Biochemical pathways. *Int J Mol Sci.* 2012;13(9):11705–17.
30. Zhou X mei, Zhang H, Han X. Role of epithelial to mesenchymal transition proteins in gynecological cancers: pathological and therapeutic perspectives. *Tumor Biol.* 2014;35(10):9523–30.
31. Zhang P, Liu Y, Feng Y, Gao S. SNAIL gene inhibited by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in epithelial ovarian cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016;29(3):364–75.
32. Zhang Y, Fan N, Yang J. Expression and clinical significance of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , Snail and E-cadherin in human ovarian cancer cell lines. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):3393–9.
33. Wu X, Zhuang YX, Hong CQ, Chen JY, You YJ, Zhang F, et al. Clinical importance and therapeutic implication of E-cadherin gene methylation in human ovarian cancer. *Med Oncol.* 2014;31(8).
34. Moselhy SS, Kumosani T a, Kamal IH, Jalal J a, Abdul Jabaar HS, Dalol A. Hypermethylation of P15, P16, and E-cadherin genes in ovarian cancer. *Toxicol Ind Health.* 2013;31(April):924–30.
35. Hua K-T, Wang M-Y, Chen M-W, Wei L-H, Chen C-K, Ko C-H, et al. The H3K9 methyltransferase G9a is a marker of aggressive ovarian cancer that promotes peritoneal metastasis. *Mol Cancer.* 2014;13(1):189.
36. Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, et al. Engagement of Collagen-Binding Integrins Promotes Matrix Metalloproteinase-9 –

- Dependent E-Cadherin Ectodomain Shedding in Ovarian Carcinoma Cells. 2007;(5):2030–40.
37. Dai C, Cao J, Zeng Y, Xu S, Jia X, Xu P. E-cadherin expression as a prognostic factor in patients with ovarian cancer : a meta-analysis. 2017;
  38. Ryabtseva OD, Polishchuk LZ, Regional L, Oncology C. Significance of Adhesion Molecules Expression for. 2013;211–8.
  39. Carduner L, Leroy-Dudal J, Picot CR, Gallet O, Carreiras F, Kellouche S. Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: Enhancement of their invasive behavior partly dependant on  $\alpha v$  integrins. Clin Exp Metastasis. 2014;31(6):675–88.
  40. Grabowska MM, Day ML. Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease. Front Biosci (Landmark Ed. 2012 Jan 1;17:1948–64.
  41. Zhao T, Zhao C, Zhou Y, Zheng J, Gao S, Lu Y. HIF-1 $\alpha$  binding to AEG-1 promoter induced upregulated AEG-1 expression associated with metastasis in ovarian cancer. Cancer Med. 2017;6(5):1072–81.
  42. Qiu X, Cheng J-C, Klausen C, Fan Q, Chang H-M, So W-K, et al. Transforming growth factor- $\alpha$  induces human ovarian cancer cell invasion by down-regulating E-cadherin in a Snail-independent manner. Biochem Biophys Res Commun. 2015;461(1):128–35.
  43. Cheng JC, Qiu X, Chang HM, Leung PCK. HER2 mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin in human ovarian cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013;434(1):81–6.
  44. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. Genes Dev. 2008;22(7):894–907.
  45. Lu YM, Shang C, Ou YL, Yin D, Li YN, Li X, et al. miR-200c modulates ovarian cancer



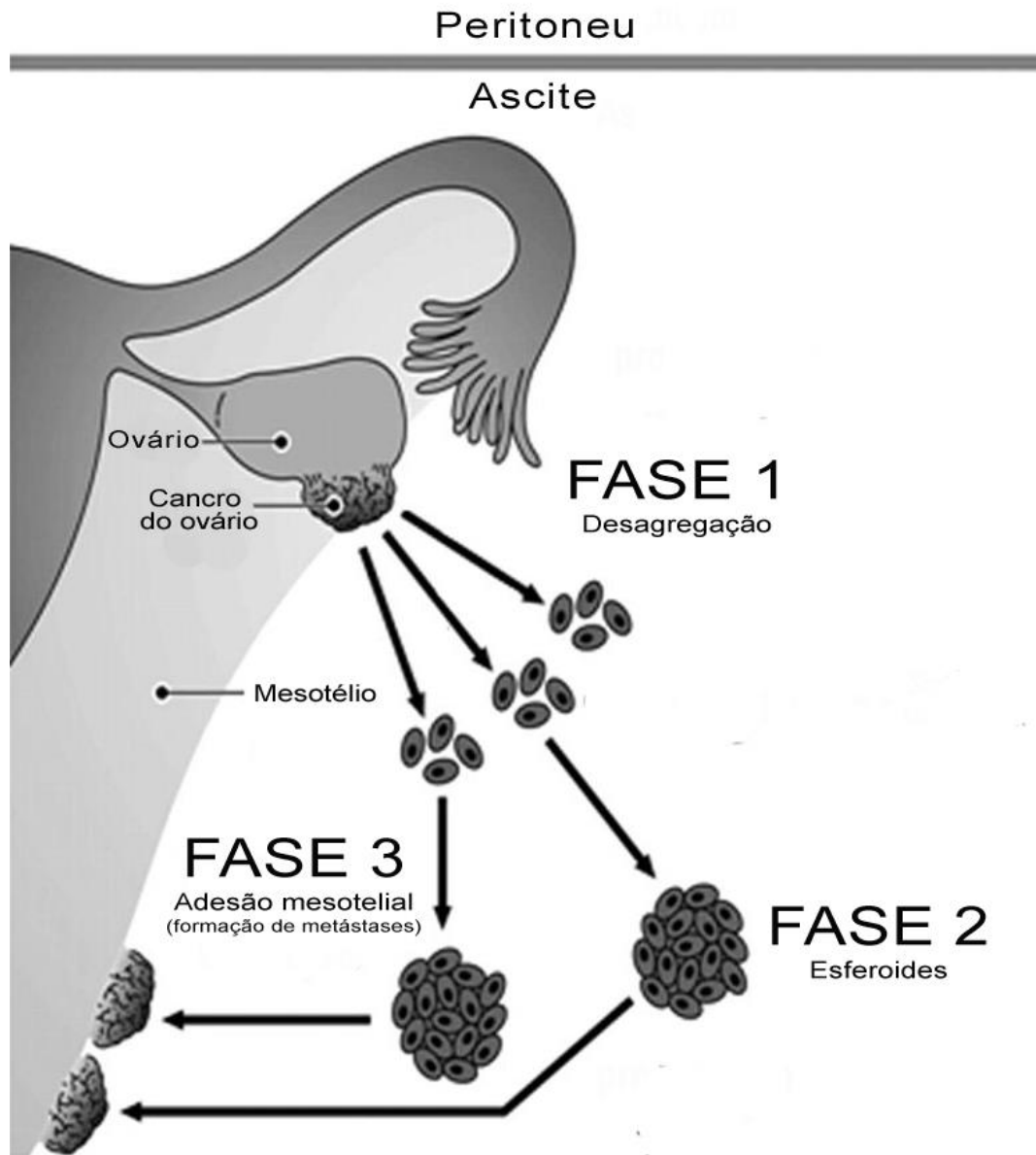
- cell metastasis potential by targeting zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) expression. *Med Oncol*. 2014;31(8).
46. Wang L, Wu X, Wang B, Wang Q, Han L. Mechanisms of miR-145 regulating invasion and metastasis of ovarian carcinoma. 2017;9(7):3443–51.
  47. Zhou B, Xu H, Xia M, Sun C, Li N, Guo E, et al. Overexpressed miR-9 promotes tumor metastasis via targeting E-cadherin in serous ovarian cancer. *Front Med*. 2017;1–9.
  48. Sun Y, Hu L, Zheng H, Bagnoli M, Guo Y, Rupaimoole R, et al. MiR-506 inhibits multiple targets in the epithelial-to-mesenchymal transition network and is associated with good prognosis in epithelial ovarian cancer. *J Pathol*. 2015 Jan;235(1):25–36.
  49. Sun Y, Mezzanzanica D, Zhang W. MiR-506: A Multitasker in Suppression of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *RNA Dis (Houston, Tex)*. 2014;1(1):e447.
  50. Elloul S, Vaksman O, Stavnes HT, Trope CG, Davidson B, Reich R. Mesenchymal-to-epithelial transition determinants as characteristics of ovarian carcinoma effusions. *Clin Exp Metastasis*. 2010;27(3):161–72.
  51. Ye Y, Tian H, Lange AR, Yearsley K, Robertson FM, Barsky SH. The genesis and unique properties of the lymphovascular tumor embolus are because of calpain-regulated proteolysis of E-cadherin. 2012;(April):1–12.
  52. Ko SY, Naora H. HOXA9 promotes homotypic and heterotypic cell interactions that facilitate ovarian cancer dissemination via its induction of P-cadherin. *Mol Cancer*. 2014;13(1):170.
  53. Klymenko Y, Kim O, Loughran E, Yang J, Lombard R, Alber M, et al. Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis. *Nat Publ Gr*. 2017;(December 2016):1–12.
  54. Cowden Dahl KD, Symowicz J, Ning Y, Gutierrez E, Fishman DA, Adley BP, et al. Matrix metalloproteinase 9 is a mediator of epidermal growth factor-dependent e-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4606–13.

## Anexos

Classificação da FIGO para o estadiamento do cancro do ovário, trompas de Falópio e peritoneu e correlação do mesmo com o estadiamento TNM da União Internacional para o Controlo do Cancro.

<b>Estádio I: tumor confinado aos ovários ou as trompas de Falópio</b>	<b>T1 – N0 – M0</b>
<b>IA:</b> tumor limitado a um ovário (cápsula intacta) ou trompa de Falópio; sem tumor na superfície do ovário ou trompa de Falópio; sem células malignas no líquido ascítico ou de lavados peritoneais	<b>T1a – N0 – M0</b>
<b>IB:</b> tumor limitado a ambos os ovários (cápsula intacta) ou trompas de Falópio; sem tumor na superfície do ovário ou trompa de Falópio; sem células malignas no líquido ascítico ou de lavados peritoneais	<b>T1b – N0 – M0</b>
<b>IC:</b> tumor limitado a um ou ambos os ovários ou trompas de Falópio, apresentando um dos seguintes: IC1: rotura capsular durante a cirurgia	<b>T1c1 – N0 – M0</b>
IC2: rotura capsular antes da cirurgia ou tumor presente na superfície do ovário ou da trompa de Falópio	<b>T1c2 – N0 – M0</b>
IC3: células malignas no líquido ascítico ou de lavados peritoneais	<b>T1c3 – N0 – M0</b>
<b>Estádio II: tumor envolve um ou ambos os ovários ou trompas de Falópio com extensão pélvica (abaixo do anel pélvico) ou tumor peritoneal</b>	<b>T2 – N0 – M0</b>
<b>IIA:</b> extensão ou implantes no útero e/ou trompas de Falópio e/ou ovários	<b>T2a – N0 – M0</b>
<b>IIB:</b> extensão a outros órgãos pélvicos intraperitoneais	<b>T2b – N0 – M0</b>
<b>Estádio III: tumor envolve um ou ambos os ovários ou trompas de Falópio, ou tumor peritoneal, com confirmação citológica ou histológica de disseminação peritoneal fora da pélvis e/ou metástases para os gânglios linfáticos retroperitoneais</b>	<b>T1/T2 – N1 – M0</b>
<b>IIIA1:</b> só gânglios linfáticos retroperitoneais positivos (confirmados histológica ou citologicamente) IIIA1(i): metástases cuja maior dimensão não ultrapassa os 10 mm IIIA1(ii): metástases cuja maior dimensão é superior a 10 mm	
<b>IIIA2:</b> envolvimento peritoneal microscópico extrapélvico (acima do anel pélvico) com ou sem nódulos linfáticos retroperitoneais positivos	<b>T3a2 – N0/N1 – M0</b>
<b>IIIB:</b> metástases peritoneais macroscópicas extrapélvicas com maior diâmetro até 2 cm, com ou sem metástases em nódulos linfáticos retroperitoneais	<b>T3b – N0/N1 – M0</b>
<b>IIIC:</b> metástases peritoneais macroscópicas extrapélvicas com maior diâmetro até 2 cm, com ou sem metástases em nódulos linfáticos retroperitoneais (incluindo extensão do tumor à cápsula do fígado e baço, sem envolvimento do parênquima de nenhum de ambos os órgãos)	<b>T3c – N0/N1 – M0</b>
<b>Estádio IV: metástases à distância, excluindo as metástases peritoneais</b>	<b>Qualquer T – Qualquer N – M1</b>
<b>IVA:</b> efusão pleural com citologia positiva <b>IVB:</b> metástases no parênquima e metástases em órgãos extra-abdominais (incluindo gânglios linfáticos inguinais e gânglios linfáticos fora da cavidade abdominal)	

**Anexo 1:** Adaptado de: Danolic D, Alvir I, Mamic I, Kostic L, Tomica D, Puljiz M, et al. Cancer of the ovary, fallopian tube and peritoneum: Surgical management. Libr Oncol. 2015;43(1–3):41–9.



**Anexo 2:** Esquema ilustrativo das três fases de metastização intra-abdominal do carcinoma ovárico. Adaptado de: Shield K, Ackland ML, Ahmed N, Rice GE. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol.* 2009;113(1):143–8.