UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LORENA ALVES TEIXEIRA

**Expressão de BRCA1 e BRCA2 por imuno-histoquímica e prognóstico no câncer de
ovário: uma revisão sistemática e meta-análise**

Ribeirão Preto
2019

LORENA ALVES TEIXEIRA

**Expressão de BRCA1 e BRCA2 por imuno-histoquímica e prognóstico no câncer de
ovário: uma revisão sistemática e meta-análise**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Teixeira, Lorena Alves

Expressão de BRCA1 e BRCA2 por imuno-histoquímica e prognóstico no câncer de ovário: uma revisão sistemática e meta-análise. Ribeirão Preto, 2019.

114 p. : il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Reis, Francisco José Candido dos.

1. Carcinoma epitelial de ovário
2. Imunoexpressão
3. Expressão da proteína
4. BRCA1
5. BRCA2
6. Sobrevida global
7. Sobrevida livre de progressão.

TEIXEIRA, L. A. **Expressão de BRCA1 e BRCA2 por imuno-histoquímica e prognóstico no câncer de ovário: uma revisão sistemática e meta-análise.** 2019. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

*Dedico este trabalho em especial aos meus queridos e amados pais **Analúcia e Gilberto**,
meus exemplos de vida repletos de sabedoria, esforço, paz, amor e fé!
Gratidão eterna pelo amor incondicional, por sempre acreditaram em mim,
incentivando, apoiando, encorajando, dando suporte em todos os sentidos.
Gratidão por tudo o que fizeram e fazem por mim ao longo de toda a minha vida.*

*À toda a minha querida e amada **família e amigos**.*

*Ao meu querido e amado **Alexandre** e sua **família**,
por estar sempre ao meu lado, cuidando de mim com amor,
paz, carinho, compreensão, dedicação, incentivo, apoio
e por terem me acolhido com tanto carinho e amor na família de vocês.*

*Ao Prof. Dr. **Francisco José Candido dos Reis**, pela paciência, sabedoria,
conhecimento, acolhimento, por me incentivar a aprender e agir a todo instante.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis**, fonte de sabedoria, organização, inspiração e equilíbrio. Minha profunda gratidão por tão dedicada orientação, pelas reuniões semanais e presenciais durante todo o nosso estudo, disponibilizando-me seu precioso tempo e esforço, fornecendo-me *insights* apreciáveis. Por abrir as portas da minha formação na vida acadêmica e na pesquisa, pelo acolhimento, pela oportunidade de eu aprender cada vez mais e por ter me ensinado a usar o R, ampliando meus conhecimentos e habilidades. Sua valiosa capacidade de planejamento, paciência, foco, competência, conselhos, dedicação, atitude positiva, atenção aos detalhes, reflexões constantes, transmissão de paz foram elementos fundamentais deste trabalho. Nesta bela e desafiadora jornada, seu compartilhamento de experiências e ensinamentos foram essenciais ao meu crescimento pessoal e profissional, assim como à execução e conclusão deste estudo. Espero um dia poder retribuir tudo o que fez por mim. Minha eterna gratidão, respeito, amizade e admiração.

Ao **Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz**, meus sinceros agradecimentos por me abrir às portas da oncogenética e da oncologia molecular, criando uma incrível oportunidade de aprendizado e desenvolvimento para mim. Gratidão eterna por sua amizade, atenção e carinho, por sua capacidade de docência ímpar, pelos conselhos, pelas valiosas contribuições em minha vida pessoal, acadêmica e carreira profissional desde a residência de oncologia clínica, *fellow* de oncogenética, até os dias de hoje.

Ao **Prof. Dr. Andrés Poveda Velasco**, exemplo de sabedoria, humildade, competência e humanidade, expresso aqui os meus profundos agradecimentos pela oportunidade de escrevermos o protocolo de manejo dos sarcomas uterinos, por me aconselhar, ampliar minhas habilidades no mundo da pesquisa, por incentivar a realização dos meus sonhos, por contribuir com nossos projetos e estudos no Brasil, por seu precioso tempo, carinho, atenção e dedicação em meu aprendizado pessoal e dos tumores ginecológicos, pelas valiosas contribuições nos manuscritos redigidos. Minha eterna gratidão e admiração.

À **Profª. Dra. Fernanda Maris Peria**, agradeço todo o seu amor e carinho durante toda a minha jornada desde a minha chegada a Ribeirão Preto. Gratidão por ter me recebido de portas abertas na residência médica de oncologia clínica e na vida fora do hospital, com dedicação, apoio em todos os momentos, por ter confiado e acreditado em mim, pelos alicerces construídos para a minha vida pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara** pelo acolhimento, conselhos, discussão de casos, exames e trabalhos, pela atenção, carinho e dedicação, pelas contribuições em meu aprendizado e sugestões propostas neste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação **Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto** e **Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva** pelas significativas contribuições ao aprimoramento deste estudo, e nos dois manuscritos gerados por este trabalho.

Ao **Dr. Fábio Eduardo Zola**, **Dr. Fernando Marin Torres** e **Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira**, agradeço por terem aberto as portas do CTO, pelos conselhos, pela confiança, estímulo intelectual, por acreditarem em mim e pelas contribuições diárias para meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional. À **Profª. Dra. Selma Freire de Carvalho da Cunha**, agradeço toda a sua amizade, dedicação, atenção, carinho, amor,

oportunidades e contribuições em minha vida. À **Dra. Marina Chaguri** e **Dr. José Cláudio Casali da Rocha**, pela amizade e apoio de sempre. Aos **Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli** pelo incentivo e palavras de estímulo, à **Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva** pelas dicas durante a construção do projeto, ao **Prof. Dr. Antônio Alberto Nogueira** pelos conselhos, ao **Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi**, **Prof. Dr. Júlio César Rosa e Silva** e a **todos os médicos assistentes, residentes e equipe multiprofissional da Mastologia e da GO** pelos ensinamentos e convivência diária, ao **Prof. Dr. Geraldo Duarte** por todo carinho e atenção, aos **Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade** e **Profa. Dra. Juliana Meola Lovato** pela atenção e oportunidades, ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, à **Profa. Dra. Edenir I. Palmero** e **Profa. Dra. Patrícia Prolla** por me ensinarem oncologia molecular e abrirem as portas de uma verdadeira paixão.

Nesta minha jornada também encontrei alguém muito especial, agente administrativa do Programa de Pós-Graduação do DGO da USP, sempre disponível em auxiliar os pós-graduandos nas questões burocráticas e pessoais, **Suelen Soares Bezerra**. Esse encontro foi um grande presente em minha vida. Querida **Sue**, agradeço sinceramente toda a sua organização, por cada momento dedicado a mim, com atenção e conselhos nos momentos que mais precisava, com inestimável estímulo diário, amizade, palavras e atitudes sábias, sempre me fazendo enxergar o lado positivo de tudo, colocando-me em minha zona de esforço para a alta performance. Aos funcionários deste departamento, querida **Ilza**, sempre atenta, ao **Ricardo**, **Rosane**, **Gabriela** e **Reinaldo** pelas contribuições na pós-graduação. À **Suleimy Cristina Mazin** por me auxiliar com o conhecimento avançado do R e me propiciar um ambiente onde pude analisar todos os dados e conduzir a meta-análise pessoalmente.

À **Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** por proporcionarem a materialização deste sonho. Sou grata também por ter recebido o prêmio de melhor projeto de pesquisa do **Research Day** do DGO da USP de 2018, sinal de recompensa quando tudo é feito com amor e dedicação. Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**).

A todos os meus amigos e amigas, colegas, professores, funcionários, equipe de enfermagem e interdisciplinar, companheiros de ambulatório da oncologia clínica e da oncogenética, especialmente **Deivid**, **Simone**, **Márcia**, **Fátima**, **Jair**, **Lisandra**, **Milena Flória**, **Leida**, **Andreza**, **Antônio Godoy**, **Bruno Filardi**, **Liane Rapatoni** e **Leandro Colli** pelas valiosas contribuições para meu desenvolvimento pessoal e intelectual. Com muito carinho agradeço ao amigo e parceiro oncologista **Marcos Benini Magário** por me apresentar ao professor, permitindo a realização deste sonho. À **Bruna Toneti** pela amizade, atenção, carinho, respeito e estímulo constante para a conclusão de minhas atividades.

À minha querida “R+”, parceira oncologista, que se tornou amiga, comadre e irmã, **Cristiane Alves Mendes**, agradeço por cada instante de amor, carinho, dedicação, incentivo, confiança, sempre contribuindo para meu crescimento em todas as áreas da vida. Sua sinceridade, esforço, sua fé e atenção são dignas de gratidão eterna. E ao **José Gabriel**, fonte de felicidade e fruto do amor de Deus por nós.

Em especial, agradeço ao meu grande amigo **Reginaldo Cruz Alves Rosa**, por todo apoio, contribuição e amizade incondicional, mesmo nos momentos mais desafiadores de minha vida, me encorajando sempre, auxiliando-me a sair da minha zona de conforto, focando

nas prioridades. Obrigada por me ensinar tanto meu amigo! Sua inteligência, cumplicidade, coragem, foco, respeito, dedicação em tudo o que faz são dignos de reverência. Tenho certeza que estaremos sempre juntos, realizando nossos sonhos, enfrentando novos desafios.

Ao **Nilo Sérgio Vieira Costa**, eterno amigo desde o primeiro dia que entramos para a faculdade de medicina, por todo amor, carinho e apoio, exemplo de ser humano. Por me ajudar a cada dia a ser uma pessoa melhor.

Às minhas amigas de longa data, **Camila, Kézzia, Luciana e Ana Luiza** que mesmo distantes fisicamente permanecem tão presentes e compreendem minha ausência.

A todas as **irmãs, irmãos, padres e consagrados** no Convento São José em Mococa e espalhados por este mundo da **Comunidade Missionária Providência Santíssima** e ao **Padre Chrystian Shankar** agradeço às orações, amizade, amor e apoio constantes.

A **todos** que desejam o melhor para mim e se sentem felizes com minhas conquistas, meus sinceros agradecimentos.

Agradecimento mais que especial, pois sem vocês, nada disso seria possível:

Aos meus queridos e amados pais, **Analúcia e Gilberto**, fonte de amor incondicional, afeto, ternura, compressão, sabedoria, fé, encorajamento, apoio pessoal, emocional, profissional, econômico. Agradeço por confiarem e acreditarem em mim, em todas as minhas decisões sem pestanejar, mantendo-me erguida em todos os momentos. Tudo em minha vida, assim como este trabalho não seriam possíveis sem a valiosa presença e esforço diário de ambos. Mesmo que muitas vezes estivéssemos distantes fisicamente, pelo *FaceTime* tudo se tornou mais fácil. Meus amores **mãe e pai**, eu verdadeiramente me orgulho de ser sua filha, e agradeço por todo o sacrifício que sempre fizeram por mim, me abençoando com a vida que tenho. Suas palavras, olhares, gestos, forças, conselhos, bênçãos, pensamentos reativam constantemente o que há de melhor em mim. Nunca terei como retribuir tanto amor, dedicação, incentivo e esforço para a concretização de todos os meus sonhos. Minha eterna gratidão e admiração pela senhora e pelo senhor. Eu os amo infinitamente.

À minha querida e amada família, de perto ou de longe, especialmente às minhas irmãs **Larissa e Luciana** por todo amor, carinho, companheirismo, apoio, conselhos e determinação e motivação, à **tia Maria**, agradeço por sua fé, seu amor, respeito e apoio constantes, presente de Deus em nossas vidas, ao meu cunhado **Daniel** e meu sobrinho e afilhado **Lucca** (meu protótipo em tudo) que trouxeram felicidade e estímulos para a concretização de meus sonhos de forma mais rápida.

Ao **Alexandre**, fonte de amor, fidelidade, compreensão, integridade, apoio, sabedoria, tranquilidade, organização, um ser iluminado por Deus, exemplo de força e serenidade. Agradeço do fundo de meu coração por você ser meu fiel companheiro, por nosso amor imensurável, parceiro de todos os instantes, por nunca ter medido esforços em me ajudar, sempre contribuindo com as mais belas palavras e gestos de motivação, nunca me deixando desistir, incentivando-me a conquistar meus sonhos, por acreditar e confiar em mim, estando ao meu lado sempre, acalmando meus anseios. **Tê e Zé**, com muito amor, agradeço por tudo o que fazem por mim e por terem me incluído na família de vocês como nora, como filha. Gratidão eterna. Amo vocês infinitamente.

A **Deus**, por me presentear com esta maravilhosa vida, por me guiar, me dar força, protegendo-me e iluminando os melhores caminhos a serem seguidos.

“Se pude enxergar mais longe foi porque estava sobre os ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

A presente dissertação encontra-se de acordo com:

- 1) Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023) para citação das referências;
- 2) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da Universidade de São Paulo (USP), versão atualizada 2016;
- 3) *Cochrane Handbook of Systematic Reviews*;
- 4) PROSPERO - *International Prospective Register of Systematic Reviews*;
- 5) PRISMA - *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*;
- 6) REMARK - *The Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*;
- 7) Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

TEIXEIRA, L. A. **Expressão de BRCA1 e BRCA2 por imuno-histoquímica e prognóstico no câncer de ovário: uma revisão sistemática e meta-análise**. 2019. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O câncer de ovário é a neoplasia maligna ginecológica de maior letalidade no mundo. As proteínas BRCA1 e BRCA2, frequentemente alteradas nos carcinomas epiteliais de ovário, apresentam-se como potenciais biomarcadores diagnósticos, preditivos de risco, de prognóstico e de resposta terapêutica, tais como quimioterapia à base de platina e terapia alvo como os inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). Apesar de numerosos estudos independentes utilizando a técnica imuno-histoquímica (IHQ) para avaliar o nível de expressão dessas proteínas e a relação com a sobrevida das pacientes com câncer de ovário, os resultados permanecem controversos. O objetivo deste estudo foi sintetizar a evidência científica sobre a utilização da IHQ para a detecção das proteínas BRCA1 e BRCA2 no carcinoma epitelial de ovário e a relação com o prognóstico das pacientes. Este estudo seguiu as diretrizes *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis* (PRISMA). Estudos analisando a expressão IHQ de BRCA1 e BRCA2 em pacientes com carcinoma epitelial de ovário invasivo foram identificados para a revisão sistemática por meio de buscas sistemáticas nos bancos de dados PubMed, Embase, Web of Science, Scopus até junho de 2019 e as listas de referências para estudos adicionais. Meta-análises de modelos de efeito fixo e aleatório foram realizadas para gerar dados combinados dos *hazard ratio* (HR) com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) para sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo com o nível de expressão proteica. Avaliou-se a qualidade de cada estudo pelas escalas *Newcastle-Ottawa Scale* (NOS) e *European Lung Cancer Working Party* (ELCWP). Dos 44 estudos elegíveis para a revisão sistemática (4.735 pacientes), 50,0% dos tumores apresentaram imunoexpressão negativa de BRCA1 (41 estudos) e 61,0% de BRCA2 (dez estudos). Quatorze estudos relacionaram a expressão de BRCA1 com a sobrevida e foram incluídos para a meta-análise. No entanto, não houve a possibilidade de combinar os resultados da expressão de BRCA2. A perda de expressão de BRCA1 em 48,5% dos casos foi associada com a melhora da SG (HR=0,77; IC95%=0,60-0,99; p=0,0415) e SLP (HR=0,75, IC95% 0,59-0,94). A alta heterogeneidade entre os estudos de SG ($I^2=72\%$, p<0,01) e moderada ($I^2=61\%$, p<0,01) de SLP foram observadas, desaparecendo após a categorização de acordo com o anticorpo MS110, ponto de corte de

10% e alta qualidade pelas escalas NOS e ELCWP ($I^2 = 34\%$, $p=0,15$). As medidas meta-analíticas do subgrupo de pacientes dos estudos que utilizaram o anticorpo MS110 e *cut-off* de 10% mostraram diferença estatística entre os grupos com expressão negativa *versus* positiva de BRCA1 a favor do grupo com redução ou ausência de expressão por IHQ tanto para SG (HR=0,67; IC95%=0,55-0,82; $p<0,0001$) quanto para SLP (HR=0,81; IC95%=0,70-0,94; $p=0,0062$). Pacientes com expressão negativa de BRCA1 nas amostras tumorais parecem apresentar melhor prognóstico. No entanto, não há nenhum protocolo padronizado e validado universalmente disponível com aplicabilidade translacional para identificação de alterações nas proteínas BRCA1 e BRCA2 pelo método imuno-histoquímico. Estudos prospectivos, com maior tamanho amostral, planejados ainda são necessários para uma validação substancial desses achados. Estudo registrado no *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO), número CRD42017070405.

Palavras-chave: Carcinoma epitelial de ovário. BRCA1. BRCA2. Recombinação homóloga. Expressão proteica. Imunoexpressão. Anticorpo. Teste imuno-histoquímico. IHQ. Biomarcador. Prognóstico. Sobrevida.

ABSTRACT

TEIXEIRA, L. A. **Expression of BRCA1 and BRCA2 by immunohistochemical and prognosis in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis.** 2019. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the leading cause of death from gynecologic malignancies in world. BRCA expression by immunohistochemistry (IHC) in EOC associated with the prognosis of these women shows discrepant results. The aim of this study was to assess all primary literature examining the relationship between BRCA1 or BRCA2 protein expression evaluated by IHC with the prognosis in EOC. Studies were systematically retrieved from the relevant databases (Embase, PubMed, Web of Science and Scopus) and the expiry date was June 2019. The main concepts for the search were ovarian neoplasms and IHC testing of BRCA1 and BRCA2. The present systematic review and meta-analysis were conducted in accordance with Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) statement. Meta-analysis was performed using R 3.5.0 software. A total of 44 studies that complied with the inclusion criteria were included in this systematic review with 4,735 patients. Fourteen studies analyzed BRCA1 expression with overall survival (OS) or progression free survival (PFS) and comprised 2,071 cases that were included in this meta-analysis. The data of BRCA1 IHC expression and survival in each eligible study were recorded and analyzed as hazard ratio (HR) and 95% confidence intervals (95% CIs) to estimate the association between BRCA1 expression and survival in EOC. However, the results of BRCA2 expression were not possible to combine in the meta-analysis. Tumor tissues of 2,071 patients with EOC were analyzed IHC staining and the results were low BRCA1 expression in 48.5% cases. In addition, low expression of BRCA1 was statistically associated with improved OS (HR=0.64; 95% CI 0.53-0.76; $p<0.001$) and PFS (HR=0.75, 95%CI 0.59-0.94). High ($I^2=72\%$, $p<0,01$) and moderate ($I^2=61\%$, $p<0,01$) heterogeneity were noted among all the OS and PFS included studies, respectively. The studies that might cause heterogeneity were excluded using the funnel plot, and then the meta-analysis was performed again. The results were similar when we analyzed separately only cohorts classified as high quality by Newcastle-Ottawa Scale (NOS) and European Lung Cancer Working Party (ELCWP) and according to the MS110 antibody and cut-off 10% for OS and PFS, both with low heterogeneity. Patients with low BRCA1 expression have a better

prognosis, however, well-design, prospective, large sample size are still needed to a substantial validation of these findings.

Registration number: This systematic review and meta-analysis protocol has been registered in the PROSPERO (No. CRD42017070405).

Keywords: Epithelial ovarian carcinoma. High-grade serous ovarian carcinoma. BRCA1. Breast cancer susceptibility gene 1. BRCA2. Breast cancer susceptibility gene 2. Homologous recombination. Immunohistochemistry. IHC. Protein expression. Antibody. Biomarker. Prognostic. Survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma PRISMA com os resultados da busca na literatura e métodos de seleção dos estudos elegíveis.....	41
Gráfico 1 - Análise de sobrevida global incluindo 2.071 pacientes	61
Gráfico 2 - Gráfico em funil da sobrevida global de 2.071 pacientes	62
Gráfico 3 - Análise de sobrevida global excluindo-se os anticorpos policlonais	62
Gráfico 4 - Análise de sobrevida global em 1.623 pacientes em estudos de alta qualidade ...	63
Gráfico 5 - Análise multivariada de sobrevida global com 1.721 pacientes	64
Gráfico 6 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise multivariada	64
Gráfico 7 - Análise multivariada de sobrevida global com 1.447 pacientes	65
Gráfico 8 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise multivariada para MS110	66
Gráfico 9 - Análise univariada de sobrevida global em 1.160 pacientes.....	66
Gráfico 10 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise univariada	67
Gráfico 11 - Análise univariada para sobrevida global e MS110.....	68
Gráfico 12 - Análise multivariada para sobrevida global e tumor seroso de alto grau	68
Gráfico 13 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise multivariada e HGSC.....	69
Gráfico 14 - Análise multivariada para sobrevida global em HGSC e MS110.....	69
Gráfico 15 – Gráfico de funil para sobrevida global multivariada por HGSC e MS110	70
Gráfico 16 - Análise de subgrupo para sobrevida global por univariada e HGSC.....	70
Gráfico 17 - Gráfico de funil para sobrevida global por univariada e HGSC	71
Gráfico 18 - Análise de subgrupo para sobrevida global por univariada, HGSC e MS110....	71
Gráfico 19 - Gráfico de funil para sobrevida global por univariada e HGSC	72
Gráfico 20 - Meta-análise para sobrevida global pelo <i>cut-off</i> 10% e MS110	73
Gráfico 21 - Análise de sobrevida livre de progressão incluindo 1.525 pacientes.....	73
Gráfico 22 - Gráfico em funil da sobrevida livre de progressão incluindo 1.525 pacientes ...	74
Gráfico 23 - Análise de sobrevida livre de progressão dos estudos simétricos em 1.417 pacientes e MS110.....	75
Gráfico 24 - Análise multivariada de sobrevida livre de progressão com MS110 em 1.219 pacientes	76
Gráfico 25 - Análise para sobrevida livre de progressão, MS110 e <i>cut-off</i> de 10% em 1.103 pacientes	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Componentes da pergunta quanto ao método imuno-histoquímico, seguindo-se o acrônimo PICOTT	29
Quadro 2 - Componentes da pergunta quanto ao prognóstico, seguindo-se o acrônimo PICOTT	29
Tabela 1 - Características dos estudos incluídos para a revisão sistemática	43
Tabela 2 - Detalhes dos estudos incluídos para a revisão sistemática quanto ao método da IHQ de BRCA1	47
Tabela 3 - Proporção de expressão negativa por IHQ de BRCA1 entre os estudos usando-se a coloração nuclear	51
Tabela 4 - Detalhes dos estudos incluídos para a revisão sistemática quanto ao método da IHQ de BRCA2	53
Tabela 5 - Sumário das características de todos os estudos potencialmente elegíveis para a meta-análise	55
Tabela 6 - Características dos estudos de BRCA1 incluídos para a meta-análise	57
Tabela 7 - Características dos estudos de BRCA2 potencialmente elegíveis para a meta-análise	58
Tabela 8 - Resumo da avaliação de qualidade, risco de viés e sobrevida de todos os estudos potencialmente elegíveis para a meta-análise	60

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA1 DNA repair associated</i>
<i>BRCA2</i>	<i>BRCA2 DNA repair associated</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DGO	Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
ELCWP	<i>European Lung Cancer Working Party</i>
EMBASE	Base de dados eletrônica da editora Elsevier
Emtree	Descritores controlados do EMBASE
EOC	<i>Epithelial ovarian carcinoma</i> (Carcinoma epitelial de ovário)
EUA	Estados Unidos da América
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> (Fixadas em formol e incluídas em parafina)
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia)
HGSC	<i>High-grade serous carcinoma</i> (Carcinoma seroso de alto grau)
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confiança
IHC	<i>Immuno-histochemistry / immuno-histochemical</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
MeSH	Descritores controlados do PubMed, do inglês <i>Medical Subject Heading</i>
NOS	<i>Newcastle-Ottawa Scale</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> [poli (ADP-ribose) polimerase]
PICOTT	[P (<i>patient / population / problem</i>) = paciente, população ou problema; I (<i>intervention / exposure / prognostic factor</i>) = intervenção, exposição ou fator prognóstico; C (<i>comparison / control</i>) = comparação ou controle; O (<i>outcome</i>) = desfecho; T (<i>type of question</i>) = tipo de questão ou pesquisa; T (<i>type of study</i>) = tipo de estudo]

PRISMA	Principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análises, do inglês <i>Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis</i>
PROSPERO	<i>International prospective register of systematic reviews</i>
PubMed	<i>Public/Publisher</i> MEDLINE
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
SE	<i>Standard error</i> (erro padrão)
SG	Sobrevida global
SIBIUSP	Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo
SLP	Sobrevida livre de progressão
SRA-DM	<i>Systematic Review Assistant package</i>
USP	Universidade de São Paulo
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i> (microarranjos teciduais)
WS	<i>Whole-slide</i> (cortes inteiros do tecido)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Local e considerações éticas.....	28
3.2 Desenho do estudo.....	28
3.3 Protocolo e registro.....	28
3.4 Perguntas da pesquisa.....	29
3.5 Critérios de elegibilidade.....	29
3.6 Critérios de exclusão dos estudos.....	30
3.7 Estratégias e métodos de busca	30
3.8 Seleção de estudos elegíveis.....	31
3.9 Extração de dados	32
3.10 Avaliação da qualidade dos estudos	33
3.11 análise e Síntese dos dados.....	33
3.12 Meta-análise e medidas de tamanho de efeito	34
3.13 Avaliação da heterogeneidade	36
3.14 Análise do risco de viés de publicação entre os estudos	36
3.15 Análise de subgrupos.....	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Busca e seleção dos estudos quanto ao método imuno-histoquímico e à sobrevida	39
4.2 Características dos estudos elegíveis para a avaliação do método de imuno-histoquímica	42
4.3 Finalidade da análise de expressão de BRCA1 e BRCA2 dos estudos	45
4.4 Métodos de imuno-histoquímica de BRCA1	46
4.5 Métodos de imuno-histoquímica de BRCA2	52
4.6 Características dos estudos de sobrevida elegíveis.....	54
4.7 Qualidade dos estudos de sobrevida.....	59

4.8 Influência da expressão de BRCA1 na sobrevida global	61
4.9 Análise de sensibilidade da sobrevida global de todos os estudos	61
4.10 Sobrevida global por análise multivariada	63
4.11 Análise de sensibilidade da sobrevida global por multivariada	64
4.12 Sobrevida global por análise univariada.....	66
4.13 Análise de sensibilidade da sobrevida global por univariada.....	67
4.14 Análise de subgrupos para sobrevida global	68
4.15 Análise de subgrupos por escore e tipo de anticorpo para sobrevida global.....	72
4.16 Influência da expressão de BRCA1 na sobrevida livre de progressão	73
4.17 Análise de sensibilidade da sobrevida livre de progressão.....	74
4.18 Sobrevida livre de progressão por análise multivariada.....	75
4.19 Análise de subgrupo por anticorpo, ponto de corte e sobrevida livre de progressão	76
 5 DISCUSSÃO	78
 6 CONCLUSÕES.....	88
 REFERÊNCIAS	90
 ANEXOS	100
 APÊNDICES	106

1 INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é a neoplasia maligna ginecológica de maior letalidade no mundo (BRAY et al., 2018). A maioria das pacientes apresenta-se com doença em estágio avançado ao diagnóstico, resultando em um prognóstico reservado (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Cerca de 90% dos tumores malignos do ovário são epiteliais, categorizando-se em cinco subtipos principais, como carcinoma seroso de alto grau, seroso de baixo grau, endometriode, de células claras e mucinoso, sendo o carcinoma seroso de alto grau o subtipo mais comum e agressivo (KURMAN; SHIH, 2010; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014). O tratamento padrão consiste em cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia à base de platina e taxano (CANNISTRA, 1993; POVEDA; ROMERO, 2016). Apesar da alta taxa de resposta inicial favorável, a mediana de recorrência da doença ocorre em 16 meses para 75% das pacientes diagnosticadas em estádios avançados, resultando em uma maior taxa de recorrência e morte pela doença (LEDERMANN et al., 2013; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017; TORRE et al., 2017). Mesmo após várias linhas de tratamentos sequenciais, a taxa de sobrevida global permanece em 20 a 30% (BRAY et al., 2018; TORRE et al., 2017). Esse desfecho reservado mantém-se constante ao longo das duas últimas décadas, apesar dos avanços referentes ao conhecimento das características tumorais e à terapêutica (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Estudos recentes destacaram a complexidade genética molecular e a heterogeneidade do câncer de ovário com distintos fatores de risco, etiopatogênese, características clínico-patológicas, comportamento biológico, prognóstico e resposta terapêutica (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KURMAN; SHIH, 2010, 2016; MCGEE et al., 2017; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014). De acordo com os dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), aproximadamente metade dos carcinomas serosos de alto grau de ovário apresenta deficiência no mecanismo de reparo do DNA pela via da recombinação homóloga (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011), sendo os genes *BRCA1* e *BRCA2* os mais acometidos (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KURMAN; SHIH, 2010, 2016; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014). A predisposição genética é responsável por 15 a 35% desses tumores, sendo a maioria atribuída às variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (CHEN; PARMIGIANI, 2007; EOH et al., 2018; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; MATULONIS et al., 2016). A identificação de pacientes portadoras de variantes germinativas

em *BRCA1* e *BRCA2* é de reconhecida importância em vários aspectos (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015), tais como o desenvolvimento de estratégias de rastreamento, programas de avaliação de risco, prevenção, medidas redutoras de risco, aconselhamento genético, assim como para os familiares devido ao risco de desenvolver principalmente câncer de mama e ovário hereditários (BARTOSCH; CLARKE; BOSSE, 2018; MATULONIS et al., 2016; REBBECK et al., 2015). É significativa também na patogênese e no manejo clínico de pacientes diagnosticadas com carcinoma epitelial de ovário tanto esporádico quanto hereditário (MATULONIS et al., 2016; REBBECK et al., 2015), que possam ser portadoras de alterações epigenéticas, somáticas ou germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015).

O *BRCA1* e o *BRCA2* são genes supressores tumorais multifuncionais e essenciais à manutenção da integridade do genoma (BILLING et al., 2018; PRAKASH et al., 2015; WALSH, 2015). Ambos participam de uma grande rede de genes e proteínas que controlam o DNA em replicação, reconhecem o dano no DNA e o reparam principalmente pela via da recombinação homóloga (D'ANDREA; GROMPE, 2003; MISTELI; SOUTOGLOU, 2009). Dessa forma, as proteínas BRCA1 e BRCA2 codificadas envolvem-se no reparo das quebras de fita dupla de DNA (ROY; CHUN; POWELL, 2012; TAKAOKA; MIKI, 2018; YOSHIDA; MIKI, 2004) e do bloqueio ou do colapso da bifurcação de replicação do DNA, também denominada de forquilha de replicação do DNA (BILLING et al., 2018; PRAKASH et al., 2015; WALSH, 2015). As alterações imunológicas e epigenéticas, genéticas e moleculares na via da recombinação homóloga, incluindo os genes *BRCA1* e *BRCA2*, podem levar à disfunção desses genes e modificação da expressão das proteínas. As variantes genéticas germinativas, somáticas e o silenciamento epigenético são as principais causas dessas alterações, resultando em reparo inadequado do DNA que pode gerar instabilidade genômica e induzir a tumorigênese (LÖBRICH; JEGGO, 2007; WALSH, 2015). Quando ocorrem defeitos nesse sistema de reparo do DNA por diversas outras alterações além das variantes germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*, compartilhando as mesmas características fenotípicas nos cânceres esporádicos, denominam-se *BRCAness* (RADOSA et al., 2011; TAN et al., 2008; TURNER; TUTT; ASHWORTH, 2004).

Os dados do TCGA integraram as alterações estruturais dos carcinomas serosos de alto grau de ovário, correlacionando-as aos desfechos clínicos (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011). A identificação dos defeitos nos genes *BRCA1* e o *BRCA2* e nas proteínas envolvidas na via da recombinação homóloga ganhou recentemente

importância no manejo dos carcinomas serosos de alto grau de ovário. Os genes *BRCA1* e o *BRCA2* tornaram-se importantes alvos terapêuticos (KURNIT; COLEMAN; WESTIN, 2018). Verificou-se que a hipoexpressão da cascata de reparo do DNA pode levar ao aumento da vulnerabilidade aos agentes que danificam o DNA, gerando instabilidade cromossômica, mudança no número de cópias do DNA e aumento da sensibilidade à quimioterapia à base de platina. A deficiência no sistema de reparo do DNA pode justificar a consequente melhora da sobrevida global nessas pacientes (CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; PENNINGTON et al., 2014). Estima-se que regimes mais agressivos de quimioterapia, como a administração intraperitoneal de platina (LESNOCK et al., 2013) e a utilização de inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase, do inglês *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) (TAN et al., 2008) poderiam beneficiar até metade das pacientes. Essas descobertas mostram como a relação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* com o prognóstico e o desenvolvimento de terapêutica dirigida aos casos com alterações na via da recombinação homóloga podem ter impacto no cenário do carcinoma epitelial de ovário, principalmente dos tumores de alto grau (BOLTON, 2012; CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015; CASS et al., 2003; CHETRIT et al., 2008; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; KOTSOPOULOS et al., 2016; PENNINGTON et al., 2014; RUBIN et al., 1996; YANG et al., 2011a).

Há diversas técnicas empregadas na detecção de disfunções de *BRCA1* e *BRCA2* (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; GARG et al., 2013). A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica laboratorial consolidada e frequentemente utilizada na patologia molecular por meio de reações antígeno anticorpo para detectar marcadores tumorais (AL-MULLA et al., 2005; BILYK et al., 2012; HASSAN et al., 2008; MILNER et al., 2013; SELVES et al., 2018). De forma geral, esse método para análise de imunexpressão de *BRCA1* e *BRCA2* é menos dispendioso e laborioso, mais acessível e reprodutível na detecção de proteínas disfuncionais (KUHN; AYHAN, 2018) do que a pesquisa das alterações no DNA por meio de sequenciamento, como nas tecnologias de nova geração. O fenótipo imuno-histoquímico pode ser empregado no diagnóstico, na identificação de genes disfuncionais, na determinação de fatores prognósticos e preditivos de resposta terapêutica (CARSER et al., 2011; HJORTKJÆR et al., 2017; KUHN; AYHAN, 2018). Os anticorpos aplicáveis podem detectar a maioria das alterações que resultam em proteínas truncadas (AL-MULLA et al., 2005; BILYK et al., 2012; HASSAN et al., 2008; MILNER et al., 2013; SELVES et al., 2018). Em pacientes com carcinoma epitelial de ovário, a expressão reduzida de *BRCA1* detectada por IHQ ou por metilação da região promotora do gene *BRCA1*

mostrou-se como importante ferramenta de utilidade clínica para promover informação prognóstica (GARG et al., 2013; WEBERPALS et al., 2011). No entanto, as evidências científicas são contraditórias na demonstração do valor prognóstico da perda de expressão de BRCA1 ou BRCA2 por IHQ no carcinoma epitelial de ovário (FURUKAWA et al., 2013; KAERN et al., 2005; SIRISABYA et al., 2007). E diversos avanços terapêuticos ainda não resultaram em mudanças significativas na abordagem das pacientes (GARG et al., 2013; WEBERPALS et al., 2011).

Os avanços da genética molecular e as mudanças recentes no conhecimento do carcinoma epitelial de ovário (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KURMAN; SHIH, 2010, 2016; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014) constituem significativas implicações à pesquisa e à prática clínica (MAHNER; PFISTERER, 2013). Contudo, esses progressos ainda não beneficiam claramente as mulheres acometidas por esta doença extremamente letal. A ampla análise das alterações estruturais genômicas, genéticas, epigenéticas e informação da expressão gênica dos carcinomas epiteliais de ovário não se encontram facilmente acessíveis ao amplo uso na prática clínica mundial (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KURMAN; SHIH, 2010, 2016; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014). Descobertas sobre a relação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* com o prognóstico e resposta terapêutica das pacientes com alterações na via da recombinação homóloga podem ter impacto nesse cenário de alta letalidade.

Diversos estudos analisaram a detecção da expressão de BRCA1, BRCA2 ou ambas pela técnica IHQ em carcinoma epitelial de ovário. No entanto, há significativas diferenças entre os métodos empregados e o valor prognóstico permanece controverso, apesar de numerosos estudos independentes. A identificação do método, do conhecimento do perfil de imunoexpressão de BRCA1 e BRCA2 e se há associação com os desfechos tornam-se importantes nesse panorama. Esta informação tem potencial, não apenas classificatória, mas pode também se constituir como mecanismo de seleção de pacientes para terapêuticas específicas e de maior efetividade como o uso dos inibidores da PARP. Dessa forma, diante da heterogeneidade do método imuno-histoquímico de BRCA1 e BRCA2 em carcinomas epiteliais de ovário disponível na literatura e da lacuna de dados associando esses resultados ao prognóstico das pacientes, justifica-se a condução de uma revisão sistemática para ampla compreensão sobre o método imuno-histoquímico utilizado na detecção de BRCA1 e BRCA2 nos carcinomas epiteliais de ovário, seguida de meta-análise para identificar se há associação prognóstica da expressão proteica desses tumores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar a evidência científica disponível na literatura sobre a utilização da imuno-histoquímica para a detecção das proteínas BRCA1 e BRCA2 no carcinoma epitelial de ovário e a relação com o prognóstico das pacientes.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os protocolos dos métodos utilizados para a realização da imuno-histoquímica de BRCA1 e BRCA2 nas amostras tumorais das pacientes com câncer epitelial de ovário;
- Descrever a frequência da expressão negativa de BRCA1 e BRCA2 por imuno-histoquímica nos carcinomas epiteliais de ovário;
- Avaliar se há associação entre a expressão negativa de BRCA1 por imuno-histoquímica com a sobrevida global nas pacientes com carcinoma epitelial de ovário;
- Avaliar se há associação entre a expressão negativa de BRCA1 por imuno-histoquímica com a sobrevida livre de progressão nas pacientes com carcinoma epitelial de ovário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e considerações éticas

Estudo conduzido no Programa de Pós-Graduação em Ciências do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) após aprovação da Comissão de Pesquisa do DGO, protocolado sob número 601.

Todas as informações foram extraídas de estudos disponibilizados pelas bases de dados eletrônicas sob domínio público e todos os estudos incluídos obtiveram aprovação dos comitês de ética das respectivas instituições de pesquisa. No Brasil, a resolução atualmente vigente do Conselho Nacional de Saúde número 510 de 07 de abril de 2016 resolveu que não são registradas ou avaliadas pelo sistema Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) / Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) estudos que utilizam informações de domínio público ou pesquisa realizada exclusivamente com textos científicos para revisão da literatura científica e que não identificam os participantes da mesma. Dessa forma, o presente estudo não necessita de aprovação por parte do Sistema CEP-CONEP.

3.2 Desenho do estudo

Conduziu-se um estudo de revisão sistemática seguida de meta-análise de dados reportados na literatura provenientes de estudos observacionais e ensaios clínicos randomizados sobre a relação da expressão das proteínas BRCA1 e BRCA2 por IHQ com o prognóstico das pacientes diagnosticadas com carcinoma epitelial de ovário.

Este estudo seguiu as recomendações dos Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises, do inglês *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis* (PRISMA) (LIBERATI et al., 2009; MOHER et al., 2009) (**Anexo A**).

3.3 Protocolo e registro

O protocolo deste estudo, devido ao caráter inédito do tema desta pesquisa, encontra-se registrado no *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO), sob número CRD42017070405 (**Anexo B**), disponível em:

https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=70405.

3.4 Perguntas da pesquisa

As perguntas para responder aos objetivos do presente estudo foram estruturadas conforme os componentes do acrônimo PICOTT [P (*patient / population / problem*) = paciente, população ou problema; I (*intervention / exposure / prognostic factor*) = intervenção, exposição ou fator prognóstico; C (*comparison / control*) = comparação ou controle; O (*outcome*) = desfecho; T (*type of question*) = tipo de questão ou pesquisa; T (*type of study*) = tipo de estudo] (OXMAN, 1993; RICHARDSON et al., 1995; SCHARDT et al., 2007), conforme mostrado nos **Quadros 1 e 2**.

Quadro 1 - Componentes da pergunta quanto ao método imuno-histoquímico, seguindo-se o acrônimo PICOTT

Descrição	Abreviação	Componentes
População	P	Pacientes com carcinoma epitelial de ovário
Intervenção	I	Método imuno-histoquímico empregado para detectar a perda de expressão das proteínas BRCA1 e BRCA2
Comparação	C	Presença de expressão de BRCA1 e BRCA2 por IHQ
Desfechos	O	Resultados da técnica empregada
Tipo de questão	T	Metodológica
Tipo de estudo	T	Observacional ou ensaio clínico randomizado

Legenda: IHQ = imuno-histoquímica

Quadro 2 - Componentes da pergunta quanto ao prognóstico, seguindo-se o acrônimo PICOTT

Descrição	Abreviação	Componentes
População	P	Pacientes com carcinoma epitelial de ovário
Intervenção (Fator prognóstico)	I	Ausência de expressão de BRCA1 e BRCA2 por IHQ
Comparação	C	Presença de expressão de BRCA1 e BRCA2 por IHQ
Desfechos	O	SG e SLP
Tipo de questão	T	Prognóstico
Tipo de estudo	T	Observacional ou ensaio clínico randomizado

Legenda: IHQ = imuno-histoquímica; SG = sobrevida global; SLP = sobrevida livre de progressão

3.5 Critérios de elegibilidade

Os estudos elegíveis para inclusão nesta revisão sistemática preencheram os seguintes critérios: estudos originais observacionais ou ensaios clínicos randomizados envolvendo pacientes com diagnóstico de câncer epitelial de ovário que tiveram a expressão de BRCA1, BRCA2 ou ambas avaliadas pelo menos por meio de IHQ nas amostras das pacientes com tumor invasivo.

Os estudos que avaliaram a associação da expressão dessas proteínas com a sobrevida das pacientes foram incluídos para a meta-análise. Os desfechos foram sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (SLP) ou ambos, e deveriam reportar a *hazard ratio* (HR), o erro padrão, do inglês *standard error* (SE) ou fornecer dados suficientes para se estimar a HR e o SE da análise de sobrevida univariada ou multivariada.

Para os estudos reportados em mais de uma ocasião, somente aqueles com maior número de pacientes, mais recentes ou com maior quantidade de dados completos disponíveis foram incluídos.

3.6 Critérios de exclusão dos estudos

As razões para exclusões de estudos da revisão sistemática com relação à técnica da IHQ seguida de meta-análise com os dados de sobrevida foram estudos não originais ou de revisão, relato de caso, não exclusivos em seres humanos, indisponíveis na íntegra, com tumores não epiteliais ou *borderline* de ovário, resultados de interesse não descritos ou com erros ou sem possibilidade de estimativas. Estudos presentes em mais de um banco de dados ou apresentados em congressos e posteriormente publicados foram contabilizados como duplicados, assim como as publicações diferentes que incluíram o mesmo grupo de pacientes, sendo consideradas como sobreposição de pacientes.

3.7 Estratégias e métodos de busca

Dois revisores independentes (LAT e FJCR) conduziram uma busca eletrônica da literatura científica em quatro diferentes bancos de dados, sem restrições quanto ao periódico, período ou idioma da publicação em março de 2017 no projeto piloto. O rastreamento inicial dos estudos baseou-se na leitura de títulos e resumos dos manuscritos de acordo com os critérios de elegibilidade previamente descritos. Em setembro do mesmo ano, em uma segunda etapa, conduziram-se uma sistemática e ampla estratégia de busca. As bases de dados utilizadas foram MEDLINE via PubMed, EMBASE, SCOPUS e Web of Science. A estratégia de busca foi ativada e atualizada semanalmente por meio do recebimento de alertas no e-mail da autora LAT até junho de 2019, a fim de identificar novos estudos elegíveis. E na terceira etapa, a literatura cinzenta e todas as listas de referências dos estudos selecionados foram ativamente revisadas de forma manual, a fim de encontrar estudos adicionais que não foram identificados pela busca eletrônica. A estratégia de pesquisa para a seleção dos estudos científicos incluiu uma combinação de palavras-chave, sinônimos, descritores controlados,

termos livres, termos truncados e texto planejado de acordo com cada tipo de banco de dados. Nas bases de dados PubMed e EMBASE, os descritores controlados *Medical Subject Heading* (MeSH) e Emtree foram empregados, respectivamente. Nos bancos SCOPUS e Web of Science, os termos de busca foram adaptados para uso de acordo com as diferenças de cada um. Os termos pesquisados foram baseados em câncer de ovário e análise da expressão das proteínas BRCA1, BRCA2 por IHQ. A descrição completa das estratégias de busca utilizadas nas bases de dados eletrônicas encontra-se nos **Apêndices A a D**.

Os artigos não disponibilizados na íntegra pela internet ou pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo (SIBIUSP) foram solicitados por e-mail aos autores correspondentes. Todos os resultados foram adicionados aos *softwares* de gerenciamento de referências bibliográficas Zotero, a fim de mesclar os resultados dos bancos de dados e remover os duplicados de forma independente. Para a de-duplicação complementar e confirmatória dos estudos, auxiliando a colaboração entre os revisores durante todo o processo da revisão sistemática, utilizou-se a ferramenta *Systematic Review Assistant package* (SRA-DM) e conduziu-se a confirmação da de-duplicação com auxílio da plataforma online Rayyan (OUZZANI et al., 2016), como forma independente de recuperação e seleção de estudos.

3.8 Seleção de estudos elegíveis

Os estudos foram selecionados para inclusão em um processo dividido em duas etapas. Na primeira, dois revisores independentes (LAT e FJCR) revisaram a relevância potencial de todos os títulos e resumos dos estudos que foram identificados a partir das buscas eletrônicas, a fim de identificar os manuscritos elegíveis de acordo com os critérios pré-definidos, selecionando-os para a leitura completa com auxílio da ferramenta online Rayyan (OUZZANI et al., 2016). Realizou-se a seleção de cada estudo por consenso entre os dois revisores (LAT e FJCR) seguindo os critérios de inclusão. Na segunda etapa, os estudos completos foram recuperados para posterior avaliação e revisados rigorosamente de acordo com os objetivos da revisão e dos critérios de inclusão para a seleção de estudos relevantes pela plataforma Rayyan (OUZZANI et al., 2016) pelos mesmos dois membros da revisão.

Todos os estudos que preencheram os critérios de elegibilidade foram incluídos para a revisão sistemática e os que continham dados das análises de sobrevida, para a meta-análise. As diferenças entre os registros dos dois revisores foram discutidas e resolvidas por consenso.

3.9 Extração de dados

Os dados extraídos foram registrados e gerenciados por meio de cinco formulários eletrônicos construídos utilizando-se a plataforma online *Research Electronic Data Capture* (REDCap) (HARRIS et al., 2009), hospedada no servidor local na FMRP da USP. Os dados extraídos pelos dois pesquisadores LAT e FJCR de forma independente foram baseados nas informações de cada estudo elegível individualmente quanto à identificação, características, método imuno-histoquímico, resultados e avaliação da qualidade.

As informações referentes aos estudos incluíram primeiro autor, ano de publicação, dados de identificação do estudo, idioma da publicação, se incluído ou não na revisão sistemática e na meta-análise, com descrição dos critérios de exclusão.

As características do estudo extraídas foram desenho do estudo, objetivos com relação à IHQ de BRCA1, BRCA2, instituição onde se conduziu a pesquisa, país de origem das pacientes, período de inclusão, número de casos invasivos de câncer epitelial do ovário, faixa etária, tipo histológico tumoral, estágio, status mutacional das pacientes para os genes *BRCA1* ou *BRCA2*.

Os dados sobre a técnica IHQ foram alvo da IHQ, tipo de material de preservação, localização da coloração, espessura do corte da amostra, tipo dos cortes [cortes inteiros do tecido, do inglês *whole-slide* (WS) e microarranjos teciduais, do inglês *tissue microarray* (TMA)], tipo de recuperação antigênica, anticorpo primário, marca, tipo de clone, diluição, referência do anticorpo, tipo de execução da IHQ, valor de corte para a definição da expressão positiva de BRCA1 e BRCA2, sistema de classificação da coloração, tipo de controle, se revisado por mais de uma patologista, número de casos com expressão negativa e positiva separadamente.

Os dados de análise de sobrevida para a meta-análise foram período de seguimento, análise de SG, SLP ou ambas, número de casos com expressão negativa e positiva das proteínas para cada tipo de análise de sobrevida, número de eventos para cada grupo, tipo de fonte dos dados, HR e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para SG e SLP, valor de p, *log-rank*, SE e estimativas dos dados para cálculo estatístico. Utilizou-se o programa *GetData Graph Digitizer* (<http://getdata-graph-digitizer.com>) para a extração de dados de sobrevida disponíveis somente por meio das curvas de Kaplan-Meier.

A avaliação de qualidade dos estudos individuais foi conduzida de acordo com as duas escalas distintas *Newcastle-Ottawa Scale* (NOS) (WELLS et al., 2018) (**Anexo C**) e *European Lung Cancer Working Party* (ELCWP) (STEELS et al., 2001) (**Anexo D**).

3.10 Avaliação da qualidade dos estudos

A avaliação de qualidade dos estudos é um método de demonstrar os critérios utilizados na pesquisa científica a fim de reduzir os vieses e aumentar a validade interna e externa. Todos os estudos que preencheram os critérios de elegibilidade, independentemente da avaliação individual da qualidade, foram incluídos para esta revisão sistemática com relação à técnica da IHQ devido à natureza exploratória da revisão. No entanto, a qualidade do método e o risco de viés de publicação de cada estudo encontram-se informalmente descritas nas limitações do presente estudo. Por outro lado, todos os estudos elegíveis para análise da sobrevida e incluídos para a meta-análise tiveram a qualidade metodológica avaliada individualmente.

Dois revisores independentes (LAT e FJCR) avaliaram a qualidade dos estudos individuais de acordo com os instrumentos distintos NOS (WELLS et al., 2018) e ELCWP (STEELS et al., 2001). Empregou-se NOS (**Anexo C**) para avaliar a qualidade do método imuno-histoquímico dos estudos observacionais incluídos para a revisão sistemática de acordo com três perspectivas gerais: (1) Seleção do estudo; (2) Comparabilidade do estudo; e (3) Exposição para estudo de caso-controle ou desfecho de interesse para estudo de coorte. Os resultados foram gerados pelo sistema de classificação por escores de estrelas que variam de zero a nove, dos quais sete ou mais estrelas indicaram baixo risco de viés em estudos individuais ou elevada qualidade metodológica. A escala ELCWP (**Anexo D**) foi usada para todos os estudos elegíveis para a meta-análise a fim de avaliar várias dimensões do método pelo escore geral em quatro categorias: (1) Desenho científico do estudo; (2) Método laboratorial com descrição usada para identificar a expressão aberrante da proteína e outros resultados associados; (3) Generalização, e (4) Análise de resultados. Cada categoria varia de zero a dez pontos, com pontuação máxima geral de 40 pontos. O escore máximo final foi apresentado como porcentagens variando de 0 a 100%. Estudos com valores maiores ou iguais a 70% indicaram maior qualidade metodológica.

3.11 Análise e síntese dos dados

Os registros dos dados foram analisados em reuniões semanais ao longo do segundo semestre de 2017, durante o ano de 2018 e primeiro semestre de 2019. Os dados divergentes foram resolvidos e finalizados após consenso entre ambos os autores. As informações necessárias que não estiveram descritas nos trabalhos foram solicitadas aos autores

correspondentes dos estudos. Os que não foram obtidos após solicitação por e-mail foram excluídos da pesquisa.

Os dados extraídos foram obtidos de amostras teciduais tumorais de acordo com os procedimentos cirúrgicos e utilizadas na análise IHQ. A análise e síntese desses dados para a revisão sistemática quanto à técnica IHQ foram apresentadas como estatística descritiva de todos os estudos incluídos e os resultados apresentados como médias ou medianas para variáveis contínuas, proporções para variáveis categóricas e tabelas sumarizadas.

A SG foi definida como o intervalo de tempo decorrido entre o diagnóstico do câncer e o óbito. A SLP foi definida como o tempo decorrido entre o início do tratamento oncológico e a identificação da primeira progressão da doença. O impacto da expressão proteica na sobrevida das pacientes com diagnóstico de câncer epitelial de ovário foi quantificado usando-se a combinação dos HRs e respectivos IC de 95%. Os dados coletados para a revisão sistemática referentes à técnica IHQ empregada encontram-se sumarizados na forma de tabelas, construídas na plataforma REDCap e exportadas ao *software Numbers* da *Apple* versão 5.1 de 2018. Os resultados para os quais não foi possível conduzir a síntese na forma de tabelas ou de gráficos apresentam-se na forma descritiva.

Os dados prontamente coletados ou estimados por meio de cálculos para a meta-análise referentes aos desfechos de cada estudo encontram-se sumarizados na forma de gráficos do tipo floresta, do inglês *forest plot*. E os dados referentes à avaliação do risco de viés de publicação entre os estudos encontram-se sumarizados na forma de gráficos do tipo funil, do inglês *funnel plot*. Esses dados foram criados utilizando-se o pacote *meta* no *software R*, versão 3.5.0 de 2018, *The R Foundation for Statistical Computing Platform*.

3.12 Meta-análise e medidas de tamanho de efeito

Conduziu-se a meta-análise dos resultados quando houve a possibilidade de combinar os dados disponíveis para avaliar quantitativamente a associação entre os níveis de expressão proteica com a sobrevida de pacientes com carcinoma epitelial de ovário.

Os dados das análises de SG e SLP de cada estudo para a meta-análise foram obtidos pelos HRs com seus respectivos IC de 95% extraídos diretamente de cada estudo original. Esses dados numéricos, assim como as medidas para o tamanho do efeito que não se encontravam prontamente disponíveis nos estudos, foram estimados indiretamente por meio de planilhas e tabelas de cálculos (PARMAR; TORRI; STEWART, 1998; TIERNEY et al., 2007) para a combinação dos dados. Os cálculos foram estimados pelo número de pacientes em cada grupo e número de eventos totais e observados em cada grupo reportado, valor de p

correspondente às estatísticas de *log-rank*, SE, tempo de seguimento, realizado *download* das curvas originais de sobrevida de cada estudo (Kaplan-Meier) no aplicativo *Colar Lite*, ampliadas para obtenção de dados e transcritos os valores de cada ponto e pelo programa *GetData Graph Digitizer* (<http://getdata-graph-digitizer.com>), extraíndo-se os dados necessários para plotagem na planilha de *Excel* fornecida pelo estudo de estimativa (TIERNEY et al., 2007).

Os desfechos relacionados ao tempo para o evento como a mortalidade na análise da SG e a progressão da doença na análise da SLP foram combinados por meio do HR de cada estudo ou da estimativa que gerou o HR e sua variância dos dados numéricos disponibilizados na publicação utilizando-se os métodos previamente descritos (PARMAR; TORRI; STEWART, 1998; TIERNEY et al., 2007). Cada respectivo IC de 95% prontamente disponível nos estudos e aqueles estimados por meio das planilhas de cálculos apresentam-se na forma de combinação dos estudos pelo gráfico de *forest plot*. As linhas horizontais demonstram o intervalo de confiança com o valor mínimo e o valor máximo dos HRs onde há uma chance de 95% de se encontrar o valor do desfecho nesse intervalo se o estudo fosse repetido infinitamente. Se o traçado horizontal toca ou cruza a linha central do *forest plot*, significa que não há diferença estatística entre os dois grupos da análise de ausência e presença de expressão proteica por IHQ.

O quadrado formado em cada linha representa o tamanho da amostra com respectivo valor de HR, sendo proporcional ao peso relativo de cada estudo para a análise final. Quanto maior o número de amostras das pacientes com carcinoma epitelial de ovário com IHQ de BRCA1 realizadas (evento/exposição), maior o peso do estudo.

O diamante sólido, assim como sua largura, representa a análise combinada de todos os estudos pelo HR total, resultado integrado dos IC de 95%. A qualidade de cada estudo não influenciou no peso representado na lateral direita do gráfico. A distribuição dos escores de qualidade de cada estudo como as variáveis discretas foram comparadas por meio de testes não paramétricos.

A observação de um $HR < 1,0$ indicou maior sobrevida, favorecendo o grupo de pacientes com carcinoma epitelial de ovário com ausência ou redução de imunoexpressão de BRCA1, indicando uma menor probabilidade de sofrer um evento, óbito na análise de SG e progressão de doença na análise de SLP. O IC de 95% correspondente ao $HR < 1,0$ indicou uma diferença estatística entre a redução da expressão de BRCA1 com o prognóstico.

3.13 Avaliação da heterogeneidade

A investigação de heterogeneidade entre os HRs individuais dos estudos de mesmo desfecho foi medida usando-se o teste estatístico Qui-quadrado (X^2) de Cochrane (teste Q) e avaliou-se a magnitude dessa heterogeneidade por meio da medida I^2 (HIGGINS, 2003; HIGGINS; THOMPSON, 2002). Essa magnitude informa sobre a consistência dos dados e é fornecida em porcentagem da variabilidade total entre os estudos, variando de 0 a 100%, sendo que valores de I^2 próximos a zero, a 25%, a 50% e a 75% indicam, respectivamente, ausência, baixa, moderada e alta heterogeneidade (HIGGINS, 2003; HIGGINS; THOMPSON, 2002). Nesta meta-análise, definiu-se um $I^2 > 37\%$ como presença de heterogeneidade suficiente para justificar a realização da análise de sensibilidade.

Os vários estudos incluídos para a meta-análise apresentam objetivos semelhantes, mas o método e condução dos mesmos não necessariamente são homogêneos. Por isso, a combinação dos dados de investigação meta-analítica ocorreu conforme o modelo de efeitos fixos e aleatórios. Quando houve heterogeneidade, considerada quando há diferença estatística entre os grupos (valor de $p < 0,05$ ou $I^2 > 37\%$), aplicou-se o modelo de efeito aleatório pelo Método de DerSimonian-Laird (HIGGINS; THOMPSON, 2002). Quando houve ausência ou reduzida heterogeneidade entre os estudos (valor de $p > 0,05$ ou $I^2 < 37\%$), utilizou-se o modelo de efeito fixo pelo Método de Mantel-Haenszel (HIGGINS; THOMPSON, 2002). Quando não há heterogeneidade entre os estudos, os modelos de efeitos fixos e aleatórios mostram os mesmos resultados.

Dessa forma, conduziu-se uma nova meta-análise para se compreender as possíveis causas de heterogeneidade entre os estudos. O $I^2 > 37\%$ evidenciou presença de heterogeneidade entre os estudos, justificando a condução da análise de sensibilidade, a fim de confirmar o poder dos achados, excluindo-se individualmente os estudos com alto potencial de causar heterogeneidade com base nos fatores metodológicos da IHQ, fatores clínicos ou patológicos, usando-se o modelo de efeito aleatório após analisar os resultados gerados pelo modelo de efeito fixo.

3.14 Análise do risco de viés de publicação entre os estudos

Pelo gráfico de funil, conduziu-se a avaliação do risco de viés entre os estudos da meta-análise. Esses gráficos identificaram possíveis vieses de publicação ou nível de qualidade metodológica da IHQ, ilustrando as heterogeneidades entre os estudos. O eixo x do gráfico em funil plota os HRs de cada estudo e o eixo y os respectivos erros padrões (SE).

Quando não foi identificado viés de publicação, as heterogeneidades encontradas foram consideradas possíveis causas de assimetrias encontradas nos gráficos em funil gerados, funcionando como forma de avaliar e ilustrar essas heterogeneidades. Quando foram identificados *outliers* nos gráficos em funil, realizou-se a análise de sensibilidade retirando-se os estudos que possuíam maior risco de causar viés de publicação e nova meta-análise foi conduzida a fim de avaliar os novos resultados combinados.

3.15 Análise de subgrupos

A meta-análise incluiu pacientes com diversos subtipos histológicos de carcinoma epitelial de ovário, distintos tipos de anticorpos anti-BRCA1 para análise IHQ de BRCA1, sistemas de escore e pontos de cortes para identificação da expressão IHQ de BRCA1. Com objetivo de identificar e avaliar os possíveis vieses de seleção dos estudos incluídos, conduziu-se a análise de subgrupos para essas diferenças. O novo HR subtotal gerado representou a análise combinada dos subgrupos de alguns estudos com relação ao subtipo histológico tumoral e método da IHQ empregada.

4 RESULTADOS

4.1 Busca e seleção dos estudos quanto ao método imuno-histoquímico e à sobrevida

A estratégia de busca pré-definida identificou 1.550 potenciais estudos elegíveis em quatro diferentes bancos de dados eletrônicos, sendo PubMed (n=223), Embase (n=510), SCOPUS (n=418), Web of Science (n=389) e mais um artigo foi encontrado na atualização ao longo da pesquisa (n=1). Após a remoção dos estudos duplicados, os títulos e resumos da busca resultante (n=918) foram lidos para a seleção dos estudos elegíveis à revisão sistemática, resultando em 104 artigos considerados relevantes para a leitura na íntegra. Todas as listas de referências dos estudos lidos na íntegra foram manualmente avaliadas, a fim de encontrar estudos adicionais não identificados pela busca eletrônica inicial, resultando em mais quatro estudos, sendo um incluído. A busca na literatura cinzenta encontrou mais dois potenciais estudos elegíveis, dos quais nenhum foi selecionado por resultados duplicados.

Dentre os 110 artigos selecionados, 16 estudos foram excluídos para a revisão sistemática por envolverem estudos sem o artigo na íntegra disponível (n=2), resumo ou apresentação oral em congresso (n=13) e estudo duplicado (n=1). Noventa e quatro manuscritos completos restantes foram cuidadosamente revisados para elegibilidade por serem considerados potencialmente relevantes. Entre eles, 50 estudos excluídos por não envolver câncer epitelial de ovário (n=5), câncer de ovário não invasivo (n=1), estudo não original (n=1), sobreposição de pacientes (n=6), estudos de linhagem celular (n=5), informação incompleta (n=7), e-mail ao autor correspondente não respondido para obtenção de dados (n=1), estudo do tipo relato de caso (n=3) e ausência da análise da expressão de BRCA1 ou BRCA2 por IHQ (n=21). A lista dos estudos lidos na íntegra e excluídos para a revisão sistemática sobre a técnica IHQ, com as respectivas razões de exclusão, encontram-se no **Apêndice E**. Não foram excluídos estudos com falhas metodológicas, porém suas limitações foram relatadas. Finalmente, um total de 44 estudos (AL-KASHWAN; AL-BEDAIRI; AL-MIDHAFFER, 2017; BAI et al., 2014; BALDWIN et al., 2000; CARSER et al., 2011; CHO et al., 2015; FERNÁNDEZ et al., 2017; FURUKAWA et al., 2013; GAN et al., 2013; GÜNEŞ; YILMAZ; UZUNLAR, 2007; HJORTKJÆR et al., 2017; JU et al., 2016; KAERN et al., 2005; KASHIMA et al., 2000; LESNOCK et al., 2013; LI et al., 2017; MCALPINE et al., 2012; MCMILLEN et al., 2012; MEISEL et al., 2014; NOMURA et al., 2016; POPOVSKA et al., 2014; PRADJATMO et al., 2014; PRESS et al., 2008; RADOSA et al., 2011; RUSSELL et al., 2000; SALLUM et al., 2018; SHAWKY et al., 2014; SHILPA et

al., 2014; SIRISABYA et al., 2007; SKYTTE et al., 2011; STRICKLAND et al., 2016; SUN et al., 2016; SWISHER et al., 2009; THRALL et al., 2006; VAZ et al., 2007; VORRIUS et al., 2009; WANG C. et al., 2004; WANG et al., 2015a, 2015b; WEBERPALS et al., 2011; YANG et al., 2011b, 2010; YE et al., 2014; ZHANG et al., 2015; ZHENG et al., 2000) foram incluídos nesta revisão sistemática com relação à técnica da IHQ de BRCA1 e BRCA2 em câncer epitelial de ovário.

Para a meta-análise subsequente foram selecionados os estudos que apresentaram estimativas de sobrevida das pacientes com câncer epitelial do ovário invasivo relacionadas com a expressão de BRCA1 ou BRCA2 por IHQ. Dos 44 estudos incluídos na síntese qualitativa quanto à técnica IHQ, 23 estudos sem dados de sobrevida foram excluídos para a meta-análise. O **Apêndice F** mostra a lista completa dos estudos prognósticos revisados na íntegra e as respectivas razões de exclusão. Estudos com falhas metodológicas não foram removidos, porém suas limitações foram relatadas. Por fim, 21 estudos foram incluídos para a revisão sistemática quanto ao prognóstico e, entre eles, mais três estudos com impossibilidade de estimativa de HR (FURUKAWA et al., 2013; KAERN et al., 2005; SIRISABYA et al., 2007) foram excluídos da síntese quantitativa, restando 18 estudos potencialmente elegíveis para a meta-análise. A **Figura 1** mostra o fluxograma de identificação, rastreamento, elegibilidade e inclusão dos estudos.

Figura 1 - Fluxograma PRISMA com os resultados da busca na literatura e métodos de seleção dos estudos elegíveis

4.2 Características dos estudos elegíveis para a avaliação do método de imunohistoquímica

As principais características dos 44 estudos incluídos nesta revisão sistemática encontram-se sumarizadas na **Tabela 1**. Como todos os estudos incluídos utilizaram amostras de pacientes com carcinoma epitelial invasivo de ovário para a análise IHQ, toda a população é de conveniência.

Nesta revisão sistemática, para reduzir o viés de idioma, nenhuma restrição quanto a linguagem da publicação foi aplicada. Dos estudos incluídos, um foi publicado em búlgaro (POPOVSKA et al., 2014), um em chinês (WANG et al., 2015a), um em espanhol (FERNÁNDEZ et al., 2017), um em turco (GÜNEŞ; YILMAZ; UZUNLAR, 2007) e todos os outros 40 estudos foram publicados em inglês. Todos os estudos utilizaram o sistema de estadiamento FIGO, exceto um que utilizou o estadiamento TNM. Trinta e quatro estudos testaram a proteína BRCA1, três estudos focaram no BRCA2 e sete estudos analisaram ambas as proteínas. Os 44 estudos incluíram um total de 4.735 pacientes com carcinoma epitelial de ovário invasivo diagnosticadas entre 1985 e 2015, dentre os quais 4.312 casos com análise de BRCA1 e 1.041 casos com análise da expressão da proteína BRCA2 avaliadas pela IHQ. Sete estudos com um total de 617 pacientes relataram a avaliação IHQ de BRCA1 e BRCA2. A mediana do tamanho da amostra entre os 44 estudos foi de 87 e média de 108 (intervalo entre 4 e 393) casos.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos para a revisão sistemática

Primeiro autor	Ano de publicação	Desenho do estudo	Período de inclusão	País	N (invasivo)	Histologia	FIGO	Alvo IHQ
Al-Kashwan (AL-KASHWAN; AL-BEDAIRI; AL-MIDHAFFER, 2017)	2017	Coorte	2014-2015	Iraque	35	Mista	Todos	BRCA1
Bai (BAI et al., 2014)	2014	Coorte	2002-2010	China	142	Mista	Todos	BRCA1
Baldwin (BALDWIN et al., 2000)	2000	Coorte	NE	EUA	98	Mista	NE	BRCA1
Carser (CARSER et al., 2011)	2011	Coorte	1985-2011	Reino Unido	292	Mista	Todos	BRCA1
Cho (CHO et al., 2015)	2015	Coorte	1996-2008	República da Korea	104	Mista	Todos	BRCA1
Fernández (FERNÁNDEZ et al., 2017)	2017	Transversal	2001-2014	Venezuela	43	Mista	NE	BRCA1
Furukawa (FURUKAWA et al., 2013)	2013	Coorte	2005-2010	Japão	14	PPSC	Avançado	BRCA1, BRCA2
Gan (GAN et al., 2013)	2013	Coorte	1991-2007	Reino Unido	174	HGSC	Todos	BRCA1
GÜNEŞ (GÜNEŞ; YILMAZ; UZUNLAR, 2007)	2007	Coorte	1995-2004	Turquia	58	Seroso*	Todos	BRCA1
Hjortkjær (HJORTKJÆR et al., 2017)	2017	Coorte	1991-1994	Dinamarca	170	Mista	Avançado	BRCA1
Ju (JU et al., 2016)	2016	Coorte	2011-2014	China	39	Mista	Todos	BRCA1
Kaern (KAERN et al., 2005)	2005	Coorte	1990-1992	Noruega	51	Mista	Avançado	BRCA1
Kashima (KASHIMA et al., 2000)	2000	Série de casos	NE e 1995-1998	Japão	44	Mista	NE	BRCA1
Lesnock (LESNOCK et al., 2013)	2013	Coorte	1998-2001	EUA	393	Mista	Avançado	BRCA1
Li (LI et al., 2017)	2017	Coorte	2008-2015	China	209	Mista	Todos	BRCA1, BRCA2
McAlpine (MCALPINE et al., 2012)	2012	Coorte	2004-2009	Canadá	131	Mista	Todos	BRCA1
McMillen (MCMILLEN et al., 2012)	2012	Coorte	2002-2007	EUA	117	Mista	Avançado	BRCA1
Meisel (MEISEL et al., 2014)	2014	Coorte	1996-2010	EUA	135	HGSC	Avançado	BRCA1
Nomura (NOMURA et al., 2016)	2016	Coorte	2000-2009 e 2009-2009	Japão e Europa	199	Seroso*	Todos	BRCA1
Popovska (POPOVSKA et al., 2014)	2014	Coorte	NE	Bulgária	29	Seroso*	NE	BRCA1
Pradjatmo (PRADJATMO et al., 2014)	2014	Coorte	NE	Indonésia	69	Mista	Todos	BRCA1

Press (PRESS et al., 2008)	2008	Coorte	2004-2005	Canadá	49	Mista	NE	BRCA1
Radosa (RADOSA et al., 2011)	2011	Coorte	2000-2005	Alemanha	27	Mista	Avançado	BRCA1
Russell (RUSSELL et al., 2000)	2000	Série de casos	NE	Reino Unido	51	Mista	Todos	BRCA1
Sallum (SALLUM et al., 2018)	2018	Coorte	1996-2013	Brasil	106	Seroso*	Todos	BRCA1
Shawky (SHAWKY et al., 2014)	2014	Coorte	2006-2007	Egito	19	Mista	Todos	BRCA1
Shilpa (SHILPA et al., 2014)	2014	Coorte	2010-2012	Índia	64	Mista	Todos	BRCA1
Sirisabya (SIRISABYA et al., 2007)	2007	Coorte	1996-1999	Tailândia	99	Mista	Todos	BRCA1
Skytte (SKYTTE et al., 2011)	2011	Série de casos	NE	Dinamarca	54	Mista	Todos	BRCA1
Strickland (STRICKLAND et al., 2016)	2016	Coorte	NE	EUA	17	HGSC	NE	BRCA1
Sun (SUN et al., 2016)	2015	Coorte	2001-2009	China	156	HGSC	Avançado	BRCA1, BRCA2
Swisher (SWISHER et al., 2009)	2009	Coorte	NE	EUA	115	Mista	Todos	BRCA1, BRCA2
Thrall (THRALL et al., 2006)	2006	Coorte	1998-2001	EUA	230	Mista	Todos	BRCA1
Vaz (VAZ et al., 2007)	2007	Coorte	2000-2002	Portugal	4	Mista	Todos	BRCA1, BRCA2
Vorrius (VORRIUS et al., 2009)	2009	Caso-controle	NE	EUA	53	Mista	NE	BRCA1, BRCA2
Wang (WANG C. et al., 2004)	2004	Série de casos	NE	Japão	76	Mista	Todos	BRCA1
Wang L (WANG et al., 2015a)	2015	Série de casos	2000-2013	China	67	Mista	NE	BRCA1
Wang Z (WANG et al., 2015b)	2015	Coorte	2005-2010	China	150	HGSC	Avançado	BRCA2
Weberpals (WEBERPALS et al., 2011)	2011	Coorte	2001-2008	Canadá	251	Mista	Avançado	BRCA1
Yang (YANG et al., 2010)	2010	Coorte	NE	EUA	223	HGSC	NE	BRCA2
Yang (YANG et al., 2011b)	2011	Coorte	1990-2006	EUA	51	Endometriode	Todos	BRCA2
Ye (YE et al., 2014)	2014	Coorte	2005-2009	China	97	Seroso*	Todos	BRCA1
Zhang (ZHANG et al., 2015)	2015	Coorte	2003-2009	China	161	Mista	Todos	BRCA1, BRCA2
Zheng (ZHENG et al., 2000)	2000	Coorte	1995-1998	EUA	38	Mista	NE	BRCA1

Legenda: *Baixo e alto grau; PPSC = Câncer seroso primário do peritônio, do inglês *Primary peritoneal serous cancer*; HGSC = Carcinoma seroso de alto grau, do inglês *High-grade serous carcinoma*; NE = Não especificado.

4.3 Finalidade da análise de expressão de BRCA1 e BRCA2 dos estudos

O principal objetivo da análise da expressão de BRCA1 ou BRCA2 em cada estudo encontra-se descrito a seguir. Entre os 41 estudos que analisaram a expressão de BRCA1, 20 (48,8%) objetivaram verificar a relação entre a expressão BRCA1 e o prognóstico das 2.954 pacientes com carcinoma epitelial de ovário (CARSER et al., 2011; CHO et al., 2015; FURUKAWA et al., 2013; GAN et al., 2013; HJORTKJÆR et al., 2017; KAERN et al., 2005; LESNOCK et al., 2013; LI et al., 2017; MCMILLEN et al., 2012; NOMURA et al., 2016; PRADJATMO et al., 2014; RADOSA et al., 2011; SALLUM et al., 2018; SHAWKY et al., 2014; SIRISABYA et al., 2007; SUN et al., 2016; SWISHER et al., 2009; THRALL et al., 2006; WEBERPALS et al., 2011; ZHANG et al., 2015), nove (21,9%) estudos investigaram a associação entre a expressão BRCA1 e as características clínico-patológicas de 584 pacientes (AL-KASHWAN; AL-BEDAIRI; AL-MIDHAFFER, 2017; FERNÁNDEZ et al., 2017; GÜNEŞ; YILMAZ; UZUNLAR, 2007; JU et al., 2016; MCALPINE et al., 2012; WANG C. et al., 2004; WANG et al., 2015a; YE et al., 2014; ZHENG et al., 2000), quatro (9,7%) verificaram a relação entre a expressão do BRCA1 e a metilação da região promotora do gene em 321 tumores (BAI et al., 2014; BALDWIN et al., 2000; SHILPA et al., 2014; STRICKLAND et al., 2016), dois (4,9%) utilizaram a IHQ como método de rastreamento para mutação germinativa em 73 pacientes (KASHIMA et al., 2000; POPOVSKA et al., 2014), seis (14,6%) estudos para detectar a deficiência de BRCA1 associada a múltiplos mecanismos biológicos em 347 tumores (MEISEL et al., 2014; PRESS et al., 2008; RUSSELL et al., 2000; SKYTTE et al., 2011; VAZ et al., 2007; VORRIUS et al., 2009).

Entre os dez estudos de BRCA2, sete (70,0%) verificaram a relação entre a expressão de BRCA2 com prognóstico das pacientes com carcinoma epitelial de ovário em 805 pacientes (FURUKAWA et al., 2013; LI et al., 2017; SUN et al., 2016; SWISHER et al., 2009; WANG et al., 2015b; YANG et al., 2011b, 2010), um estudo (10,0%) investigou a relação entre a expressão de BRCA2 com as características clínico-patológicas de 161 pacientes (ZHANG et al., 2015), e dois (20,0%) estudos para detectar a deficiência de BRCA2 associada a múltiplos mecanismos biológicos em 58 tumores (VAZ et al., 2007; VORRIUS et al., 2009).

4.4 Métodos de imuno-histoquímica de BRCA1

Os detalhes do método imuno-histoquímico utilizado nos estudos incluídos sobre a expressão de BRCA1 nesta revisão sistemática encontram-se na **Tabela 2**. Para a coloração da proteína BRCA1, as amostras tumorais foram fixadas em formol e incluídas em parafina, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) em 43 estudos e um estudo utilizou a amostra tecidual congelada. Os cortes inteiros do tecido, do inglês *whole-slide* (WS), foram usados em 25 estudos, microarranjos teciduais, do inglês *tissue microarray* (TMA) em 13 estudos, em dois estudos o tipo de corte não foi descrito e em um estudo, a IHQ foi realizada em ambos WS e TMA. A espessura dos cortes foi descrita em 30 estudos de BRCA1, variando de 3 a 5 µm, com 15 (30,0%) usando 4 µm, e para os 11 estudos restantes, esta informação não foi descrita. Doze tipos de anticorpos primários anti-BRCA1 foram usados em 41 estudos, e um estudo não descreveu os detalhes do anticorpo usado. O clone monoclonal anti-BRCA1 de rato (MS110) foi utilizado em 31 (75,5%) estudos. Um estudo testou dois anticorpos e um estudo testou seis tipos de anticorpos. As lâminas foram incubadas com cada anticorpo com diluição variando de 1:10 a 1:5000, e em doze estudos as diluições não foram descritas. O período de incubação variou de 30 minutos a 16h para BRCA1 a uma temperatura de 4 a 37°C.

Havia dois sistemas de escores para avaliar o nível da expressão de BRCA1. Em 18 estudos, a pontuação foi feita pela porcentagem de células tumorais positivas independentemente da intensidade, em dois estudos, a pontuação foi feita apenas pela intensidade de células tumorais com expressão IHQ positiva, e em 19 estudos a pontuação foi feita considerando-se a porcentagem de células tumorais positivas e a intensidade da coloração. Um estudo não descreveu o sistema de escore utilizado. Em 28 estudos foi considerada apenas a expressão nuclear, em dez estudos a expressão citoplasmática e nuclear foram consideradas e em um estudo apenas a expressão citoplasmática. Dois estudos não reportaram esses dados. O valor de *cut-off* para considerar a perda de expressão do BRCA1 foi de 10% de células tumorais positivas em 24 estudos, 5% em dois estudos, 1% em dois estudos e para um estudo, apenas a ausência completa da coloração foi considerada perda de expressão. As análises da IHQ pelos patologistas ocorreram sob condições cegas com relação aos dados clínicos das pacientes em 26 de 41 (63,5%) estudos de BRCA1, sendo que em 6 desses estudos foram utilizadas análises automatizadas. As amostras de controle foram utilizadas a fim de garantir a qualidade dos métodos imuno-histoquímicos em 35 dos 41 (85,5%) estudos de BRCA1.

Tabela 2 - Detalhes dos estudos incluídos para a revisão sistemática quanto ao método da IHQ de BRCA1

Estudo, ano de publicação	Espessura (µm)	Recuperação antigênica	Anticorpo primário (diluição)	Incubação (temperatura °C)	Execução	Coloração	Sistema de escore	Cut-off positivo	N Negativo/total (%)
(AL-KASHWAN; AL-BEDAIRI; AL-MIDHAFFER, 2017)	WS (5)	Tampão Citrato, DakoCytomation, banho-maria	Dako GLK-2 (1:50)	30 min (37)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P + I	H-score >47	23/28 (82,2%)
(BAI et al., 2014)	WS (4)	Citrato de sódio, calor	Merck Calbiochem MS110 (1:100)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	P + I	Qualquer	67/142 (47,2%)
(BALDWIN et al., 2000)	WS (NE)	Solução Dako, calor	Oncogene MS110 (1:150)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	I	0	14/21 (66,6%)
(CARSER et al., 2011)	WS (3)	Panela de pressão	Merck Calbiochem MS110 (1:200)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	P	>10%	120/292 (41,0%)
(CHO et al., 2015)	TMA (4)	Citrato de sódio, microondas	Abcam MS110 (1:100)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P + I	Qualquer	58/104 (55,7%)
(FERNÁNDEZ et al., 2017)	TMA (4)	Citrato, banho-maria	(NE) MS110 (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P	>10%	15/43 (34,9%)
(FURUKAWA et al., 2013)	NE (NE)	NE	Merck MS110 (NE)	(NE) (NE)	Manual	NE	P	≥10%	2/14 (14,3%)
(GAN et al., 2013)	TMA (4)	Citrato, microondas	Merck Calbiochem MS110 (1:80)	60 min (NE)	Manual e automatizada	Nuclear	P + I	H-score >70	117/139 (84,2%)
(GÜNEŞ; YILMAZ; UZUNLAR, 2007)	WS (4)	NE	NeoMarkers GLK-2 (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P + I	Qualquer	19/58 (32,7%)
(HJORTKJÆR et al., 2017)	WS (4)	TEG, microondas	Calbiochem MS110 (1:600)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	P	>10%	65/170 (38,2%)
(JU et al., 2016)	WS (4)	EDTA, panela de pressão	(NE) Anti-BRCA1 (NE)	Overnight (4)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P + I	Qualquer	31/39 (79,5%)

(KAERN et al., 2005)	WS (5)	Citrato, microondas	Oncogene MS110 (1:200) Phenopath	30 min (NE)	Manual	Nuclear	P	≥10%	30/46 (65,2%)
(KASHIMA et al., 2000)	WS (5)	NE	Laboratory GLK-2 (1:10000)	Overnight (4)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P + I	Qualquer	10/44 (22,7%)
	WS (5)	NE	Oncogene Ab-2 (1:10)	Overnight (4)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P + I	Qualquer	7/44 (15,9%)
(LESNOCK et al., 2013)	WS (5)	NE	Oncotech MS110 (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P	>10%	189/393 (48,1%)
(LI et al., 2017)	TMA (5)	Citrato, calor	Proteintech 20649-1-AP rabbit (1:300)	14 h (4)	Manual	NE	P + I	Qualquer	132/205 (64,4%)
(MCALPINE et al., 2012)	TMA (4)	Std CC2, UltraMap Kit	Calbiochem MS110 (1:10, 1:25, 1:50, 1:75)	(NE) (NE)	Manual e automatizada	Nuclear	P	>1%	59/131 (45,0%)
(MCMILLEN et al., 2012)	TMA (4)	NE	EMD Calbiochem MS110 (NE)	(NE) (NE)	Manual e automatizada	NE	I	Qualquer	54/105 (52,4%)
(MEISEL et al., 2014)	TMA e WS (NE)	EDTA, calor	Merck Calbiochem MS110 (1:100)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P	>10%	48/135 (35,5%)
(NOMURA et al., 2016)	WS (4)	Dako, calor	Merck Anti-BRCA1(1:100)	1 h (*)	Manual e automatizada	Nuclear	P + I	≥10%	75/199 (37,7%)
(POPOVSKA et al., 2014)	WS (4)	Solução Dako, microondas	Abcam MS110 (1:50)	30 min (*)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P	>10%	19/29 (65,5%)
(PRADJATMO et al., 2014)	WS (3-5)	NE	Biocare Medical MS110 (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P	≥10%	47/69 (68,1%)
(PRESS et al., 2008)	WS (NE)	EDTA, microondas e banho-maria	Oncogene MS110 (1:50)	(NE) (NE)	Manual e automatizada	Nuclear	P	>1%	23/49 (47,0%)
(RADOSA et al., 2011)	WS (NE)	Citrato, calor	Merck MS110 (1:200)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	P + I	>10%	12/27 (44,5%)

(RUSSELL et al., 2000)	WS (NE)	NE	Calbiochem (MS110, Ab-2 e Ab-3) Pharmingen (a.a. 2-20, a.a. 768-793 e a.a.1847-1863) (1:100)	120 min (*)	Manual	Citoplasmática	P	>10%	22/51 (43,2%)
(SALLUM et al., 2018)	TMA (4)	Tampão Citrato, microondas	Merck Millipore MS110 (1:100)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	P + I	≥5%	64/104 (61,5%)
(SHAWKY et al., 2014)	WS (4-5)	NE	Mybiosource Ab-1423 (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P	>10%	13/25 (52,0%)
(SHILPA et al., 2014)	TMA (5)	Tris EDTA, vapor	Biocare Medical MS110 (1:50)	1h30 (*)	Manual	Nuclear	P + I	>10%	45/64 (70,3%)
(SIRISABYA et al., 2007)	WS (3)	Citrato-fosfatase, microondas	BioGenex Ab No 345P (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P	>10%	87/99 (87,9%)
(SKYTTE et al., 2011)	WS (3)	TEG, microondas	Merck MS110 (1:1000)	Overnight (Refrigerador)	Manual e automatizada	Nuclear	P	≥10%	18/54 (33,4%)
(STRICKLAND et al., 2016)	WS (NE)	EDTA, calor	Merck Calbiochem MS110 (1:100)	30 min (*)	Manual	Nuclear	P + I	≥5%	1/17 (5,9%)
(SUN et al., 2016)	TMA (4)	Ácido cítrico, alta pressão	Abcam MS110 (1:50)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P + I	Qualquer	14/156 (8,9%)
(SWISHER et al., 2009)	NE (NE)	Solução Dako, calor a vapor	Oncogene MS110 (1:250)	14-16 h (4)	Manual	Nuclear	P	≥10%	39/115 (34,0%)
(THRALL et al., 2006)	WS (5)	Solução Dako, calor a vapor	Oncotech MS110 (1:50)	1 h (*)	Manual	Nuclear	P	≥10%	125/230 (54,4%)
(VAZ et al., 2007)	WS (NE)	Citrato, calor	Oncogene MS110 (1:300)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear	P	>10%	3/4 (75,0%)
(VORRIUS et al., 2009)	TMA (NE)	Calor	Merck EMD Calbiochem MS110 (NE)	60 min (37)	Automatizada	Nuclear	P + I	>10%	39/53 (73,6%)
(WANG C. et al., 2004)	WS (3)	Citrato, calor	Oncogene MS110 (NE)	Overnight (4)	Manual	Nuclear	P + I	≥10%	55/76 (72,4%)

(WANG et al., 2015a)	TMA (4)	Ácido cítrico, alta pressão	(NE) MS110 (NE)	(NE) (NE)	Manual	Nuclear e citoplasmática	NE	NE	56/67 (83,6%)
(WEBERPALS et al., 2011)	TMA (5)	NE	Calbiochem MS110 (1:100)	1 h (*)	Manual e automatizada	Nuclear	P + I	Qualquer	163/251 (65,0%)
(YE et al., 2014)	WS (4)	Solução Dako, panela de pressão	Merck Anti-BRCA1(1:100)	1 h (*)	Manual	NE	P + I	>10%	29/97 (29,9%)
(ZHANG et al., 2015)	TMA (NE)	Microondas	Santa Cruz Rabbit anti-BRCA1 (1:100)	2 h (NE)	Manual	Nuclear	P + I	>10%	57/161 (35,4%)
(ZHENG et al., 2000)	WS (5)	Calor	Oncogene MS110 (1:200)	Overnight (4)	Manual	Nuclear e citoplasmática	P + I	Qualquer	25/38 (65,8%)

Legenda: *Temperatura ambiente; TMA= *tissue microarray*; WS= *whole-slide*; NE= Não especificado; P= porcentagem; I= intensidade.

A **Tabela 3** sumariza a proporção da perda de expressão de acordo com o ponto de corte utilizado e o tipo de tumor. A proporção combinada da perda de expressão de BRCA1 foi de 47,0% com *cut-off* de 10% de células positivas, 72,7% com *cut-off* de 5% de positividade, 45,5% com *cut-off* de 1% e 66,6% com ausência completa de coloração das células tumorais. Considerando-se todos os estudos de BRCA1, independente do ponto de corte, 2.089 das 4.179 pacientes (50,0%) apresentaram IHQ negativa para BRCA1.

Tabela 3 - Proporção de expressão negativa por IHQ de BRCA1 entre os estudos usando-se a coloração nuclear

Ponto de corte	Histologia	Tipo de tumor	Estudos (n)	Total amostras (n)	BRCA1 negativo (n)	Proporção de BRCA1 negativo (%)
10%	Todos	Esporádico	8	1282	649	51
		Esporádico e Hereditário ou Familiar	5	250	89	36
		Desconhecido	11	971	438	45
	Seroso	Desconhecido	4	383	142	37
	HGSC	Esporádico e Hereditário ou Familiar	1	135	48	35
		Desconhecido	1	116	31	27
	PPSC	Esporádico e Hereditário ou Familiar	1	14	2	14
5%	Todos	Esporádico e Hereditário ou Familiar	1	17	1	6
		Desconhecido	3	372	282	76
1%	Todos	Esporádico e Hereditário ou Familiar	2	180	82	45
Qualquer	Todos	Esporádico	4	587	269	46
		Esporádico e Hereditário ou Familiar	2	193	71	27
		Desconhecido	3	348	221	63
H-score $\geq$ 47	Todos	Desconhecido	1	28	23	82
H-score>70	HGSC	Esporádico	1	139	117	84

Legenda: PPSC= Câncer seroso primário do peritônio, do inglês *Primary peritoneal serous cancer*; HGSC= Carcinoma seroso de alto grau, do inglês *High-grade serous carcinoma*

4.5 Métodos de imuno-histoquímica de BRCA2

Os detalhes do método imuno-histoquímico utilizado nos estudos incluídos sobre a expressão de BRCA2 nesta revisão sistemática encontram-se descritos na **Tabela 4**. Para a análise da coloração de BRCA2, os blocos de FFPE foram usados em todos os dez estudos incluídos. Os cortes de tecido utilizados, as soluções de recuperação de antígeno correspondente para cada anticorpo e a espessura dos cortes diferiram entre os estudos. A espessura dos cortes foi descrita em cinco (50%) estudos, variando de 4 µm (um estudo) a 5 µm (quatro estudos). Quatro estudos (40%) utilizaram o clone monoclonal de rato anti-BRCA2 Mab2476 da R&D Systems, e seis outros tipos diferentes de anticorpos foram utilizados. As lâminas foram incubadas com cada anticorpo com diluição variando de 1:30 a 1: 300 para a proteína BRCA2, no entanto, há três estudos sem essa descrição. O período de incubação variou de 60 minutos a 16h para a proteína BRCA2 a uma temperatura de 4 a 37°C.

A avaliação da técnica IHQ para análise da expressão de BRCA2 difere entre os estudos. Houve dois sistemas para marcar e classificar a expressão. Em cinco estudos, a pontuação foi feita pela porcentagem de células tumorais positivas independentemente da intensidade, em cinco estudos a pontuação foi feita considerando-se a porcentagem de células tumorais positivas e a intensidade da coloração. Em oito estudos, apenas a expressão nuclear foi considerada e, em dois estudos, não houve a descrição se a expressão foi considerada nuclear ou citoplasmática. O ponto de corte para considerar a perda de expressão de BRCA2 foi de 10% em cinco estudos e de 5% em dois outros estudos. Nos três estudos restantes, um utilizou o ponto de corte ≥ 2 , outro utilizou escore ≥ 4 e um não descreveu o ponto de corte.

O sistema de pontuação utilizado foi a porcentagem de células tumorais com coloração positiva em cinco de dez estudos, e a combinação da porcentagem de células tumorais com coloração positiva e a intensidade de coloração nos outros 50,0% dos estudos. Entre as 1.079 pacientes com carcinoma epitelial do ovário dos estudos elegíveis, 1.071 tiveram as amostras de tecido analisadas para BRCA2, e 646 pacientes (60,3%) tiveram expressão negativa ou reduzida. As análises e interpretações das colorações IHQs pelos patologistas sob condições cegas com relação aos dados clínicos das pacientes foram realizadas para 8 dos 10 (80%) estudos de BRCA2, sendo que em um outro estudo utilizou-se a análise automatizada. As amostras de controle foram usadas para garantir a qualidade dos métodos de IHQ de BRCA2 em todos os nove dos dez estudos, exceto por um estudo que não reportou essa informação.

Tabela 4 - Detalhes dos estudos incluídos para a revisão sistemática quanto ao método da IHQ de BRCA2

Estudo, ano de publicação	Espessura (μm)	Recuperação antigênica	Anticorpo primário (diluição)	Tempo de incubação (temperatura)	Execução	Coloração	Sistema de escore	Cut-off positivo	N Negativo/total (%)
(FURUKAWA et al., 2013)	NE (NE)	NE	R&D Systems Mab2476 (NE)	NE (NE)	Manual	NE	P	$\geq 10\%$	0/14 (0,0%)
(LI et al., 2017)	TMA (5)	Citrato, calor	Proteintech 19791-1-ap rabbit (1:300)	14 h (4°C)	Manual	NE	P + I	Qualquer	176/207 (85,0%)
(SUN et al., 2016)	TMA (4)	EDTA	R&D Systems Mab2476 (1:30)	NE (NE)	Manual	Nuclear	P + I	Qualquer	12/156 (7,7%)
(SWISHER et al., 2009)	NE (NE)	Solução Dako, calor a vapor	Santa Cruz Biotech H-300 rabbit (1:100)	14-16 h (4°C)	Manual	Nuclear e citoplasmática*	P	$\geq 10\%$	49/115 (42,6%)
(VAZ et al., 2007)	WS (NE)	Citrato, calor	Calbiochem (ab-2), rabbit IgG (1:100)	NE (NE)	Manual	Nuclear	P	$> 10\%$	2/4 (50,0%)
(VORRIUS et al., 2009)	TMA (NE)	Calor	Santa Cruz Genetex, Catalog 70,121; 3E6 (NE)	60 min (37°C)	Automatizada	Nuclear	P + I	$> 10\%$	47/54 (87,0%)
(WANG et al., 2015b)	TMA (5)	Citrato, microondas	Santa Cruz Biotechnology Anti-BRCA2 (NE)	NE (NE)	Manual	Nuclear	P + I	Qualquer	123/150 (82,0%)
(YANG et al., 2010)	TMA (5)	Citrato de sódio, microondas	R&D Systems Mab2476 (1:200 or 1:100)	Overnight (4°C)	Manual	Nuclear	P	$\geq 5\%$	188/223 (84,3%)
(YANG et al., 2011b)	TMA (5)	Citrato de sódio, microondas	R&D Systems Mab2476 (1:200 or 1:100)	Overnight (4°C)	Manual	Nuclear	P	$\geq 5\%$	30/51 (58,8%)
(ZHANG et al., 2015)	TMA (NE)	Microondas	Santa Cruz Rabbit (1:100)	2 h (NE)	Manual	Nuclear	P + I	$> 10\%$	68/161 (42,2%)

Legenda: *escore pela coloração nuclear. Abreviações: TMA= *tissue microarray*; WS= *whole-slide*; NE=Não especificado; P = porcentagem; I = intensidade.

4.6 Características dos estudos de sobrevida elegíveis

A **Tabela 5** mostra as principais características dos 21 estudos selecionados para esta revisão sistemática relacionada ao prognóstico das pacientes com câncer de ovário. O método IHQ foi usado para avaliar a expressão da proteína BRCA1, BRCA2 ou ambas em tecidos de câncer de ovário em todos os estudos, de acordo com os critérios de inclusão. O desenho de todos os estudos foi do tipo coorte e publicados no idioma inglês entre 2005 e 2018. Eles incluíram 3.161 pacientes com carcinoma epitelial de ovário diagnosticadas de 1985 a 2015, entre as quais 2.738 haviam analisado a expressão de BRCA1 nas amostras teciduais e 1.079 casos com expressão da proteína BRCA2 avaliada pela IHQ. Cinco estudos com um total de 655 pacientes avaliaram ambas as expressões de BRCA1 e de BRCA2 por IHQ. A mediana do tamanho da amostra entre os 21 estudos foi de 143,7 (variação de 14 a 393) casos. Treze estudos testaram a proteína BRCA1, enquanto que outros três estudos focaram em BRCA2, e cinco estudos analisaram ambas as proteínas.

Tabela 5 - Sumário das características de todos os estudos potencialmente elegíveis para a meta-análise

Primeiro autor (Ano de publicação)	Período de inclusão	País de coleta de amostras	N (invasivo)	Histologia (FIGO)	Epítipo alvo (IHQ)
Carser (2011) (CARSER et al., 2011)	1985-2011	Reino Unido	292	Mista (Todos)	BRCA1
Cho (2015) (CHO et al., 2015)	1996-2008	República da Coreia	104	Mista (Todos)	BRCA1
Furukawa (2013) (FURUKAWA et al., 2013)	2005-2010	Japão	14	PPSC (Avançado)	BRCA1, BRCA2
Gan (2013) (GAN et al., 2013)	1991-2007	Reino Unido	174	HGSC (Todos)	BRCA1
Hjortkjær (2017) (HJORTKJÆR et al., 2017)	1991-1994	Dinamarca	170	Mista (Avançado)	BRCA1
Kaern (2005) (KAERN et al., 2005)	1990-1992	Noruega	51	Mista (Avançado)	BRCA1
Lesnock (2013) (LESNOCK et al., 2013)	1998-2001	EUA	393	Mista (Avançado)	BRCA1
Li (2017) (LI et al., 2017)	2008-2015	China	209	Mista (Todos)	BRCA1, BRCA2
McMillen (2012) (MCMILLEN et al., 2012)	2002-2007	EUA	117	Mista (Avançado)	BRCA1
Pradjatmo (2014) (PRADJATMO et al., 2014)	NE	Indonésia	69	Mista (Todos)	BRCA1
Radosa (2011) (RADOSA et al., 2011)	2000-2005	Alemanha	27	Mista (Avançado)	BRCA1
Sallum (2018) (SALLUM et al., 2018)	1996-2013	Brasil	106	Seroso* (Todos)	BRCA1
Sirisabya (2007) (SIRISABYA et al., 2007)	1996-1999	Tailândia	99	Mista (Todos)	BRCA1
Sun (2015) (SUN et al., 2016)	2001-2009	China	156	HGSC (Avançado)	BRCA1, BRCA2
Swisher (2009) (SWISHER et al., 2009)	NE	EUA	115	Mista (Todos)	BRCA1, BRCA2
Thrall (2006) (THRALL et al., 2006)	1998-2001	EUA	230	Mista (Todos)	BRCA1
Wang (2015) (WANG et al., 2015b)	2005-2010	China	150	HGSC (Avançado)	BRCA2
Weberpals (2011) (WEBERPALS et al., 2011)	2001-2008	Canadá	251	Mista (Avançado)	BRCA1
Yang (2010) (YANG et al., 2010)	NE	EUA	223	HGSC (NE)	BRCA2
Yang (2011) (YANG et al., 2011b)	1990-2006	EUA	51	Endometrióide (Todos)	BRCA2
Zhang (2015) (ZHANG et al., 2015)	2003-2009	China	161	Mista (Todos)	BRCA1, BRCA2

Legenda: *Baixo e alto grau; PPSC = Câncer seroso primário do peritônio, do inglês *Primary peritoneal serous cancer*; HGSC = Carcinoma seroso de alto grau, do inglês *High-grade serous carcinoma*; NE = Não especificado.

Três estudos foram excluídos da meta-análise porque a estimativa da HR não foi possível (FURUKAWA et al., 2013; KAERN et al., 2005; SIRISABYA et al., 2007). As **Tabelas 6 e 7** resumizam os resultados de 18 dos 21 estudos elegíveis para a meta-análise que associaram os dados de sobrevida das pacientes com carcinoma epitelial de ovário com a expressão das proteínas BRCA1, BRCA2 ou ambas analisadas por IHQ. Treze de 18 manuscritos elegíveis para a síntese quantitativa consistem em estudos de coorte retrospectivos, um outro estudo foi uma coorte prospectiva e quatro estudos de coorte não descreveram o delineamento da coleta de dados. Os desfechos clínicos avaliados foram SG ou SLP, ou ambas. Houve um elevado grau de variabilidade entre os estudos com relação ao método da IHQ de BRCA1, BRCA2 e o sistema de escore utilizado para quantificar o nível de expressão das proteínas por meio da análise da coloração das lâminas. Para a análise de BRCA1, nove dos 18 estudos (50,0%) utilizaram o escore baseado na porcentagem de células tumorais com coloração positiva, oito dos 18 estudos (44,5%) usaram a combinação da porcentagem de células tumorais com coloração positiva com a intensidade de coloração, e um estudo utilizou apenas a intensidade (5,5%). Entre as 2.738 pacientes com carcinoma epitelial do ovário dos estudos elegíveis, 2.672 tiveram as amostras de tecido analisadas pela expressão de BRCA1, sendo que 1.370 pacientes (51,3%) tiveram expressão negativa ou reduzida de BRCA1. Escolheu-se o ponto de corte de 10% como expressão negativa de BRCA1 para realizar a meta-análise dos estudos que possibilitaram essa classificação pelo fornecimento de dados completos das pacientes por escore da IHQ, contabilizando os dados de expressão negativa e equívoca versus positiva, e para combiná-los com outros estudos. Para realizar outras análises estatísticas a fim de sintetizar esses dados, a escolha desse ponto de corte também foi necessária.

Para BRCA2, o sistema de pontuação utilizado nos estudos de sobrevida foi a porcentagem de células tumorais com coloração positiva em dois de cinco estudos, e a combinação da porcentagem de células tumorais com coloração positiva e a intensidade de coloração nos outros três estudos (**Tabela 7**). Entre as 789 pacientes com carcinoma epitelial de ovário dos estudos de BRCA2 elegíveis, 784 tiveram as amostras de tecido analisadas, e 535 pacientes (68,0%) tiveram expressão negativa ou reduzida, sendo que a maioria desses cinco estudos apresentou expressão reduzida de BRCA2 em mais de 80% dos casos. Como estes dados não condizem com o perfil de alterações esperados para BRCA2 e há grande divergência entre os métodos empregados, a meta-análise para BRCA2 não foi conduzida por impossibilidade de combinação dos dados dos estudos.

Tabela 6 - Características dos estudos de BRCA1 incluídos para a meta-análise

Estudo	Desenho do estudo	Total de invasivos (n)	Idade (variação em anos)	Anticorpo primário (diluição)	Cut-off positivo	Sistema de escore	Seguimento (meses)	N negativo/ total (%) por SG	N negativo/ total (%) por SLP
(CARSER et al., 2011)	Coorte retrospectiva	292	Mediana 59 (33-84)	Merck Calbiochem MS110 (1:200)	>10%	P	NE	120/292 (41,0%)	120/292 (41,0%)
(CHO et al., 2015)	Coorte NE	104	Média 54 (21-82)	Abcam MS110 (1:100)	≥6 escore (0-8)	P + I	Mediana 70	58/104 (55,7%)	58/104 (55,7%)
(GAN et al., 2013)	Coorte NE	174	Mediana 61 (36-86)	Merck Calbiochem MS110 (1:80)	H-score >70 (0-300)	P + I	NE	112/131 (85,5%)	77/94 (82,0%)
(HJORTKJÆR et al., 2017)	Coorte retrospectiva	170	Média 54 (29-70)	Calbiochem MS110 (1:600)	>10%	P	NE	65/170 (38,2%)	NE
(LESNOCK et al., 2013)	Coorte retrospectiva	393	Média 57 (25-85)	Oncotech MS110 (NE)	>10%	P	Mediana 86	189/393 (48,1%)	189/393 (48,1%)
(LI et al., 2017)	Coorte NE	209	Média 55 (NE)	Proteintech 20649-1-AP rabbit (1:300)	≥2 escore (0-3)	P + I	Mediana 45 (2-90)	132/205 (64,4%)	129/197 (65,5%)
(MCMILLEN et al., 2012)	Coorte retrospectiva	117	Mediana 59 (34-90)	EMD Calbiochem MS110 (NE)	>1.5* (0-3)	I	(14-82)	54/105 (51,5%)	NE
(PRADJATMO et al., 2014)	Coorte prospectiva	69	NE	Biocare Medical MS110 (NE)	≥10%	P	(12-54)	47/69 (68,1%)	NE
(RADOSA et al., 2011)	Coorte retrospectiva	27	Mediana 57 (42-79)	Merck MS110 (1:200)	>10%	P + I	NE	12/27 (44,5%)	12/27 (44,5%)
(SALLUM et al., 2018)	Coorte retrospectiva	106	Média 57 (NE)	Merck Millipore MS110 (1:100)	≥10%	P + I	Mediana 54	59/83 (71,0%)	59/83 (71,0%)
(SUN et al., 2016)	Coorte retrospectiva	156	Média 51 (NE)	Abcam MS110 (1:50)	>4* escore	P + I	NE	14/156 (9,0%)	14/156 (9,0%)
(SWISHER et al., 2009)	Coorte retrospectiva	115	(NE) (23-80)	Oncogene MS110 (1:250)	≥10%	P	NE	39/115 (34,0%)	NE
(THRALL et al., 2006)	Coorte retrospectiva	230	NE (NE)	Oncotech MS110 (1:50)	≥10%	P	NE	97/152 (63,8%)	97/152 (63,8%)
(WEBERPALS et al., 2011)	Coorte retrospectiva	251	Média 57 (NE)	Calbiochem MS110 (1:100)	>2.5 escore (0-9)	P + I	Mediana 45	NE	75/116 (65,5%)
(ZHANG et al., 2015)	Coorte retrospectiva	161	NE (NE)	Santa Cruz Rabbit anti-BRCA1 (1:100)	>10%	P + I	NE	57/161 (35,4%)	NE

Legenda: NE= Não especificado; SG= Sobrevida global; SLP= Sobrevida livre de progressão; *Escore médio; P= Porcentagem; I= Intensidade.

Tabela 7 - Características dos estudos de BRCA2 potencialmente elegíveis para a meta-análise

Estudo	Desenho e coleta de dados	Total de invasivos (n)	Idade (variação em anos)	Anticorpo primário (diluição)	Cut-off positivo	Sistema de escore	Mediana de seguimento (meses)	N negativo/total (%) por SG	N negativo/total (%) por SLP
(LI et al., 2017)	Coorte NE	209	Média 55 (NE)	Proteintech 19791-1-ap rabbit (1:300)	≥ 2 escore (0-3)	P + I	45 (2-90)	176/207 (85,0%)	169/198 (85,4%)
(SUN et al., 2016)	Coorte retrospectiva	156	Média 51 (NE)	R&D Systems Mab2476 (1:30)	$>4^*$ escore	P + I	NE	12/156 (7,7%)	12/156 (7,7%)
(YANG et al., 2010)	Coorte retrospectiva	223	NE (NE)	R&D Systems Mab2476 (1:200 ou 1:100)	$\geq 5\%$	P	NE	188/223 (84,3%)	168/201 (83,5%)
(YANG et al., 2011b)	Coorte retrospectiva	51	Média 58 (22-83)	R&D Systems Mab2476 (1:200 ou 1:100)	$\geq 5\%$	P	132	30/45 (66,7%)	35/50 (70,0%)
(WANG et al., 2015b)	Coorte retrospectiva	150	Mediana 57 (31-85)	Santa Biotechnology BRCA2 (NE)	Cruz Anti- ≥ 4 escore (0-12)	P + I	33	124/148 (83,8%)	119/143 (83,2%)

Legenda: *Escore médio; NE= Não especificado; SG= Sobrevida global; SLP= Sobrevida livre de progressão; P= Porcentagem; I= Intensidade.

4.7 Qualidade dos estudos de sobrevida

A avaliação da qualidade dos estudos com dados prognósticos elegíveis e os respectivos resultados encontram-se quantitativamente resumidos nesta revisão sistemática. O escore de qualidade global para os estudos de BRCA1 incluídos e avaliados de acordo com a escala ELCWP variou de 45,5 a 95,7% com média de 76,4% e pela NOS variou de 4 a 8 com média de 7. E para os estudos de BRCA2, houve pela escala ELCWP uma variação de 34,9 a 83,2% com uma média de 76,4% e pela NOS, houve variação de 4 a 8 com uma média de 6. Os detalhes da avaliação do risco de viés de cada estudo individualmente e o impacto da redução da expressão de BRCA1 e BRCA2 por IHQ na SG e SLP das pacientes com carcinoma epitelial de ovário encontram-se na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Resumo da avaliação de qualidade, risco de viés e sobrevida de todos os estudos potencialmente elegíveis para a meta-análise

Estudo	ELCWP (%)	NOS (0-9)	SG	SLP	Epítipo alvo (IHQ)
(CARSER et al., 2011)	91,25	8	↑↑	↑↑	BRCA1
(CHO et al., 2015)	87,86	8	↑↑	↑↑	BRCA1
(FURUKAWA et al., 2013)	45,51	4	Não possível NE	NA	BRCA1
	34,88	4		NA	BRCA2
(GAN et al., 2013)	84,88	8	↑↑	↑↑	BRCA1
(HJORTKJÆR et al., 2017)	85,00	8	↑↑	NA	BRCA1
(KAERN et al., 2005)	49,32	6	Não possível	NA	BRCA1
(LESNOCK et al., 2013)	95,71	8	⇔	⇔	BRCA1
(LI et al., 2017)	73,57	6	↓↓	↓↓	BRCA1
	73,57	6	↓↓	↓↓	BRCA2
(MCMILLEN et al., 2012)	50,71	5	⇔	NA	BRCA1
(PRADJATMO et al., 2014)	51,19	6	⇔	NA	BRCA1
(RADOSA et al., 2011)	87,68	8	↑↑	↑↑	BRCA1
(SALLUM et al., 2018)	88,13	8	⇔	⇔	BRCA1
(SIRISABYA et al., 2007)	50,42	4	Não possível	Não possível	BRCA1
(SUN et al., 2016)	74,76	7	⇔	⇔	BRCA1
	74,76	7	⇔	⇔	BRCA2
(SWISHER et al., 2009)	90,80	8	↑↑	NA	BRCA1
	65,18	5	NE	NA	BRCA2
(THRALL et al., 2006)	94,38	8	↑↑	↑↑	BRCA1
(WANG et al., 2015b)	80,18	8	↓↓	↓↓	BRCA2
(WEBERPALS et al., 2011)	95,71	8	NA	↑↑	BRCA1
(YANG et al., 2010)	65,09	8	↓↓	↓↓	BRCA2
(YANG et al., 2011b)	83,21	8	↓↓	↓↓	BRCA2
(ZHANG et al., 2015)	77,71	6	↓↓	NA	BRCA1
	44,58	4	NE	NA	BRCA2

Legenda: ↑↑= aumento; ↓↓= redução; ⇔= sem diferença entre os grupos; NE= Não especificado; NA= não aplicável; NOS= *Newcastle-Ottawa Scale* e ELCWP= *European Lung Cancer Working Party*

4.8 Influência da expressão de BRCA1 na sobrevida global

Quatorze estudos com 2.227 pacientes reportaram a relação da expressão de BRCA1 por IHQ com a SG em 2.071 pacientes com carcinoma epitelial de ovário. Houve perda da expressão IHQ em 48,50% das amostras. A meta-análise desses estudos indicou que houve uma diferença estatística entre os grupos com expressão positiva e negativa. E que a redução ou a ausência da expressão IHQ de BRCA1 favoreceu a SG pelo modelo de efeito aleatório (HR=0,77; IC95%=0,60-0,99; p=0,0415), apesar do valor estatístico limítrofe, com alta heterogeneidade ($I^2=72\%$, $p<0,01$) conforme mostra o **Gráfico 1**.

Gráfico 1 - Análise de sobrevida global incluindo 2.071 pacientes

4.9 Análise de sensibilidade da sobrevida global de todos os estudos

A análise de sensibilidade foi conduzida para se identificar a possível causa da alta heterogeneidade encontrada na relação entre a ausência ou redução da expressão de BRCA1 por IHQ com a SG, conforme mostrado no **Gráfico 1** com $I^2=72\%$. E conforme mostra o **Gráfico 2**, os estudos de Li e colaboradores (LI et al., 2017) e Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2015) foram os responsáveis por causar a alta heterogeneidade.

Gráfico 2 - Gráfico em funil da sobrevida global de 2.071 pacientes

Dentre os 14 estudos incluídos na meta-análise, esses dois estudos foram os únicos que utilizaram anticorpos policlonais anti-BRCA1. Todos os outros 12 estudos utilizaram o anticorpo monoclonal MS110. Após a retirada desses dois estudos da medida meta-analítica, houve uma discreta mudança no HR, mantendo resultado semelhante. No entanto, houve redução da heterogeneidade entre os estudos, com $I^2=29\%$, $p=0,16$, conforme mostra o **Gráfico 3**. Neste caso, os estudos tornaram-se mais homogêneos porque não se rejeitou a hipótese nula (H_0), porém sem mudar a direção do impacto na medida meta-analítica.

Gráfico 3 - Análise de sobrevida global excluindo-se os anticorpos policlonais

Com objetivo de avaliar o impacto causado pelos estudos de pior qualidade na análise de SG, realizou-se uma nova medida meta-analítica incluindo somente os estudos com baixo risco de viés ($NOS \geq 7$ ou $ELCWP \geq 70\%$), conforme mostrado na **Tabela 8**. A nova meta-análise indicou que das 1.767 pacientes incluídas nesses estudos, foram apresentados dados de sobrevida ou puderam ser estimados para 92% delas e houve um aumento da diferença estatística entre os grupos. A redução ou a ausência da expressão IHQ de BRCA1 favoreceu a SG pelos modelos de efeito fixo e aleatório ($HR=0,64$; $IC95\%=0,53-0,76$; $p<0,001$) com baixa heterogeneidade ($I^2=31\%$, $p=0,16$), conforme mostra o **Gráfico 4**.

Gráfico 4 - Análise de sobrevida global em 1.623 pacientes em estudos de alta qualidade

4.10 Sobrevida global por análise multivariada

O **Gráfico 5** mostra os estudos incluídos na meta-análise que analisaram a relação da expressão IHQ de BRCA1 com a SG por análise multivariada. Onze dos 14 estudos reportaram os dados em 1.721 pacientes com carcinoma epitelial de ovário. A meta-análise dos estudos que analisaram a sobrevida por análise multivariada do modelo de risco proporcional de Cox indicou que não houve uma diferença estatística entre os grupos. Esses dados sugerem que não houve impacto no prognóstico das pacientes com redução ou a ausência da expressão de BRCA1 ou aquelas com alta expressão de BRCA1 ($HR=0,92$; $IC95\%=0,66-1,27$). Resultados com alta heterogeneidade ($I^2=71\%$) pelo modelo de efeito aleatório, o mais indicado neste caso, conforme mostra o **Gráfico 5**.

Gráfico 5 - Análise multivariada de sobrevida global com 1.721 pacientes

4.11 Análise de sensibilidade da sobrevida global por multivariada

A análise de sensibilidade foi conduzida para se identificar a possível causa da alta heterogeneidade encontrada na relação entre a ausência ou redução da expressão de BRCA1 por IHQ com a SG, conforme mostrado no **Gráfico 5**, com $I^2=71\%$.

Gráfico 6 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise multivariada

E conforme mostra o **Gráfico 6**, os estudos de Li e colaboradores (LI et al., 2017) e Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2015) foram os responsáveis por causar a alta heterogeneidade. Dentre os 11 estudos incluídos na meta-análise, esses dois estudos foram os únicos que utilizaram anticorpos policlonais anti-BRCA1. Todos os outros 9 estudos utilizaram o anticorpo monoclonal MS110. Após a retirada desses dois estudos da medida meta-analítica, houve uma significativa mudança no resultado do HR e houve uma expressiva redução da heterogeneidade entre os estudos, com $I^2 = 6\%$, $p = 0,39$, conforme mostra o **Gráfico 7**. Neste caso, os estudos tornaram-se mais homogêneos porque não se rejeitou a hipótese nula (H_0), e com grande impacto na medida meta-analítica, favorecendo a sobrevida das pacientes do grupo com redução ou ausência da expressão de BRCA1.

Gráfico 7 - Análise multivariada de sobrevida global com 1.447 pacientes

Quando há uma heterogeneidade substancial entre os estudos da meta-análise, o gráfico em funil deve ser construído quando o número de estudos incluídos na medida meta-analítica for maior ou igual dez estudos. No entanto, foi construído este novo gráfico após a retirada dos estudos que utilizaram outros anticorpos do que o MS110, com baixa heterogeneidade, para comparação das análises e dos resultados (**Gráfico 8**).

Gráfico 8 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise multivariada para MS110

4.12 Sobrevida global por análise univariada

O **Gráfico 9** mostra os nove dos 14 estudos incluídos na meta-análise que analisaram a relação da expressão IHQ de BRCA1 com a SG por análise univariada em 1.160 pacientes com carcinoma epitelial de ovário. Essa meta-análise indicou uma diferença estatística entre os grupos, favorecendo o prognóstico das pacientes com redução ou a ausência da expressão de BRCA1 pelo modelo de efeito aleatório (HR=0,71; IC95%=0,51-0,99), apesar do valor estatístico limítrofe, com alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2=72\%$, $p<0,01$).

Gráfico 9 - Análise univariada de sobrevida global em 1.160 pacientes

4.13 Análise de sensibilidade da sobrevida global por univariada

A análise de sensibilidade foi conduzida para se identificar a possível causa da alta heterogeneidade encontrada na relação entre a ausência ou redução da expressão de BRCA1 por IHQ com a SG, conforme mostrado no **Gráfico 9**, com $I^2=72\%$. E após remover o estudo de Li e colaboradores (LI et al., 2017) da meta-análise, responsável pela assimetria apresentada no **Gráfico 10**, houve uma redução nos valores (HR=0,63; IC95%=0,49-0,83) e na heterogeneidade entre os estudos, com $I^2= 47\%$, $p=0,07$, apesar de ainda considerada como presença de moderada heterogeneidade (**Gráfico 11**). Provavelmente esse estudo foi o responsável por causar a heterogeneidade entre os estudos por não utilizar o anticorpo MS110.

Gráfico 10 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise univariada

Gráfico 11 - Análise univariada para sobrevida global e MS110

4.14 Análise de subgrupos para sobrevida global

Tendo em vista que os HGSCs de ovário são os mais comuns entre as neoplasias malignas do ovário e que esse subtipo histológico é o que apresenta a maior prevalência de alterações no gene *BRCA1*, foi conduzida a análise de subgrupo de acordo com a análise de sobrevida multivariada (**Gráfico 12**) seguida da análise de sensibilidade (**Gráfico 13**). Considerando-se todos os estudos que apresentaram dados de SG por análise multivariada, não houve diferença entre os grupos negativo e positivo para a imunexpressão de BRCA1 (HR=0,86; IC95%=0,51-1,43), com moderada heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 61\%$, $p=0,04$) (**Gráfico 12**).

Gráfico 12 - Análise multivariada para sobrevida global e tumor seroso de alto grau

Apesar da limitação de se construir um *funnel plot* quando há alta heterogeneidade entre os estudos com $k=5$, o **Gráfico 13** demonstra a análise de subgrupo por subtipo histológico. O único estudo que utilizou o anticorpo policlonal para verificar o nível da expressão de BRCA1 por IHQ também foi responsável pela assimetria.

Gráfico 13 - Gráfico em funil da sobrevida global por análise multivariada e HGSC

Após a remoção do estudo responsável por causar essa assimetria conforme demonstrado no **Gráfico 13**, a diferença entre os grupos torna-se significativa tanto no modelo de efeito fixo (HR=0,66; IC95%=0,48-0,92), quanto no modelo de efeito aleatório (HR=0,66; IC95%=0,48-0,92), sem heterogeneidade entre os estudos ($I^2=0\%$, $p=0,85$), conforme demonstrado no **Gráfico 14**.

Gráfico 14 - Análise multivariada para sobrevida global em HGSC e MS110

O novo *funnel plot* demonstra a simetria do subgrupo pela análise de SG por multivariada dos casos de HGSC que utilizaram o anticorpo MS110 (**Gráfico 15**).

Gráfico 15 – Gráfico de funil para sobrevida global multivariada por HGSC e MS110

Após selecionar os estudos que utilizaram da análise univariada para comparar a relação da SG com o nível de expressão de BRCA1 por IHQ nas pacientes com HGSC, os dados combinados de quatro estudos nesse subgrupo não mostraram diferenças estatísticas entre os casos com redução ou ausência de expressão daqueles com expressão preservada (**Gráfico 16**), com presença de alta heterogeneidade entre as coortes. E a análise de sensibilidade (**Gráfico 17**) encontrou assimetria também no único estudo que utilizou o anticorpo policlonal para verificar a expressão de BRCA1 por IHQ.

Gráfico 16 - Análise de subgrupo para sobrevida global por univariada e HGSC

Gráfico 17 - Gráfico de funil para sobrevida global por univariada e HGSC

Após a remoção do estudo responsável pela assimetria conforme demonstrado no **Gráfico 17**, a diferença entre os grupos dos três estudos selecionados torna-se significativa tanto no modelo de efeito fixo (HR=0,59; IC95%=0,42-0,83), quanto no modelo de efeito aleatório (HR=0,59; IC95%=0,42-0,83), com ausência de heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 0\%$, $p=0,73$), conforme demonstrado no **Gráfico 18**.

Gráfico 18 - Análise de subgrupo para sobrevida global por univariada, HGSC e MS110

O novo *funnel plot* demonstra a simetria do subgrupo pela análise de SG por univariada dos casos de HGSC que utilizaram o anticorpo MS110 (**Gráfico 19**).

Gráfico 19 - Gráfico de funil para sobrevida global por univariada e HGSC

4.15 Análise de subgrupos por escore e tipo de anticorpo para sobrevida global

Com o objetivo de homogeneizar as coortes selecionadas para a medida meta-analítica, a análise de subgrupo foi realizada pelo valor de corte de 10% pelo sistema de escore para avaliar a expressão de BRCA1 por IHQ e com o anticorpo MS110. Foram 1.457 amostras tumorais das pacientes com câncer de ovário analisadas. Nesses nove estudos, houve perda da expressão IHQ em 44,1% das amostras. Os resultados sugerem uma associação com a melhora da SG dos casos com expressão negativa de BRCA1 em relação às amostras com expressão $\geq 10\%$ (HR=0,67; IC95%=0,55-0,82; $p < 0,0001$) pelo modelo de efeito aleatório, com baixa heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 34\%$, $p = 0,15$), conforme demonstrado no **Gráfico 20**.

Gráfico 20 - Meta-análise para sobrevida global pelo *cut-off* 10% e MS110

4.16 Influência da expressão de BRCA1 na sobrevida livre de progressão

Dez estudos com 1.846 pacientes reportaram a relação da expressão de BRCA1 por IHQ com a SLP em 1.525 pacientes com carcinoma epitelial de ovário. Houve perda da expressão IHQ em 51,1% das amostras. A meta-análise desses estudos indicou que houve uma diferença estatística entre os grupos com expressão positiva e negativa, e que a redução ou a ausência da expressão IHQ de BRCA1 favoreceu a SLP pelo modelo de efeito aleatório (HR=0,75; IC95%=0,59-0,94) e com moderada heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 61\%$; $p < 0,01$) conforme mostra o **Gráfico 21**.

Gráfico 21 - Análise de sobrevida livre de progressão incluindo 1.525 pacientes

4.17 Análise de sensibilidade da sobrevida livre de progressão

A análise de sensibilidade foi conduzida para se identificar a possível causa da moderada heterogeneidade ($I^2 = 61\%$) encontrada na relação entre a ausência ou redução da expressão de BRCA1 por IHQ com a SLP, conforme mostrado no **Gráfico 21**. E como mostra o **Gráfico 22**, o estudo de Li e colaboradores (LI et al., 2017) foi o responsável por causar a assimetria no *Funnel Plot*. Dentre os dez estudos incluídos na meta-análise, esse estudo foi o único que utilizou um anticorpo policlonal anti-BRCA1. Todos os outros nove estudos utilizaram o anticorpo monoclonal MS110. Após a retirada desse estudo da medida meta-analítica, houve uma discreta mudança no HR (HR=0,70; IC95%=0,58-0,84), mantendo resultado semelhante à meta-análise com dez estudos (HR=0,75; IC95%=0,59-0,94). No entanto, houve redução da heterogeneidade entre os estudos, com $I^2=39\%$, $p=0,11$, conforme mostra o **Gráfico 23**.

Gráfico 22 - Gráfico em funil da sobrevida livre de progressão incluindo 1.525 pacientes

Gráfico 23 - Análise de sobrevida livre de progressão dos estudos simétricos em 1.417 pacientes e MS110

É interessante observar que em relação aos estudos que avaliaram a SLP, todos os estudos incluídos apresentaram baixo risco de viés, conforme mostrado na **Tabela 8**. Sendo assim, não houve a necessidade de se conduzir uma nova meta-análise desses estudos quanto à avaliação da qualidade.

4.18 Sobrevida livre de progressão por análise multivariada

O **Gráfico 24** mostra os estudos incluídos na meta-análise que analisaram a relação da expressão de BRCA1 por IHQ com uso do anticorpo MS110 com a SLP por análise multivariada. Sete estudos reportaram os dados em 1.455 pacientes com carcinoma epitelial de ovário. A meta-análise dos estudos que analisaram a sobrevida por análise multivariada do modelo de risco proporcional de Cox de 1.219 pacientes indicou que houve uma diferença estatística entre os grupos com expressão positiva *versus* negativa, e que há impacto no prognóstico das pacientes com redução ou a ausência da expressão de BRCA1 (HR=0,77; IC95%=0,65-0,91) com baixa heterogeneidade entre os estudos ($I^2=20\%$), conforme mostra o **Gráfico 24**.

Gráfico 24 - Análise multivariada de sobrevida livre de progressão com MS110 em 1.219 pacientes

4.19 Análise de subgrupo por anticorpo, ponto de corte e sobrevida livre de progressão

Considerando-se apenas os seis estudos que analisaram a SLP por emprego do anticorpo MS110 e valor do ponto de corte de 10% para avaliar a expressão de BRCA1 por IHQ nas amostras tumorais de carcinoma epitelial de ovário, das 1.204 pacientes incluídas, foram analisados os dados de SLP para 1.103 pacientes. Houve perda da expressão IHQ em 45,5% das amostras. As medidas meta-analíticas desse subgrupo de pacientes mostraram que houve diferença estatística entre os grupos com expressão negativa *versus* positiva de BRCA1 a favor do grupo com redução ou ausência de expressão de BRCA1 por IHQ (HR=0,81; IC95%=0,70-0,94; $p=0,0062$) pelo modelo de efeito fixo (**Gráfico 25**), com baixa heterogeneidade entre os estudos ($I^2=17\%$, $p=0,30$).

Gráfico 25 - Análise para sobrevida livre de progressão, MS110 e *cut-off* de 10% em 1.103 pacientes

5 DISCUSSÃO

Os valores clínico-patológico, genético molecular, prognóstico e preditivo da expressão negativa de BRCA1 (CARSER et al., 2011; CHO et al., 2015; FURUKAWA et al., 2013; GAN et al., 2013; HJORTKJÆR et al., 2017; KAERN et al., 2005; LESNOCK et al., 2013; LI et al., 2017; MCMILLEN et al., 2012; NOMURA et al., 2016; PRADJATMO et al., 2014; RADOSA et al., 2011; SALLUM et al., 2018; SHAWKY et al., 2014; SIRISABYA et al., 2007; SUN et al., 2016; SWISHER et al., 2009; THRALL et al., 2006; WEBERPALS et al., 2011; ZHANG et al., 2015) e BRCA2 (FURUKAWA et al., 2013; LI et al., 2017; SUN et al., 2016; SWISHER et al., 2009; WANG et al., 2015b; YANG et al., 2011b, 2010) por IHQ foram estudados em diversos tumores malignos de ovário. Estudos envolvendo pacientes com carcinoma epitelial de ovário sugeriram que a ausência ou a perda de expressão de BRCA1 (CARSER et al., 2011; GARG et al., 2013; HJORTKJÆR et al., 2017; KASHIMA et al., 2000, 2000; KUHN; AYHAN, 2018; MEISEL et al., 2014; SUN et al., 2016; YANG et al., 2011b, 2010) foi um biomarcador prognóstico ou preditivo (CARSER et al., 2011; CHO et al., 2015; GAN et al., 2013; HJORTKJÆR et al., 2017; RADOSA et al., 2011; SWISHER et al., 2009; THRALL et al., 2006; WEBERPALS et al., 2011). Em outros estudos, contudo, a ausência ou redução da expressão de BRCA1 ou BRCA2 não se correlacionaram com as taxas de sobrevida (LESNOCK et al., 2013; LI et al., 2017; MCMILLEN et al., 2012; PRADJATMO et al., 2014; SALLUM et al., 2018; SUN et al., 2016; WANG et al., 2015b; YANG et al., 2011b, 2010; ZHANG et al., 2015). A detecção da expressão de BRCA1 e BRCA2 por IHQ em carcinomas epiteliais de ovário e a associação prognóstica permanece controversa, apesar dos numerosos estudos independentes. Esta é a primeira revisão sistemática seguida de meta-análise que sintetiza a evidência científica sobre a utilização da IHQ na detecção do nível de expressão das proteínas BRCA1 e BRCA2 em carcinoma epitelial de ovário e a relação com o prognóstico das pacientes. Este estudo sugere que o método de detecção IHQ de BRCA1 nesses tumores é efetivo na identificação de pacientes com comprometimento funcional dessa proteína de reparo do DNA por mecanismos genéticos e epigenéticos, possui valor prognóstico e preditivo de resposta terapêutica, no entanto, ainda é ineficiente para BRCA2.

Dentre os estudos elegíveis, esta revisão sistemática revela que 2.089 (50,0%) pacientes em 41 estudos e 695 (61,0%) pacientes em dez estudos apresentam imunoexpressão negativa de BRCA1 e BRCA2, respectivamente. Observa-se uma grande discrepância na

frequência da expressão deficiente entre os estudos, variando de 6,0% a 88,0% para BRCA1 e de 0,0% a 87,0% para BRCA2. Considerando-se todos os tipos de anticorpos empregados listados nas **Tabelas 2 e 4** e o comum 10% de ponto de corte, 47,0% dos carcinomas epiteliais de ovário apresentam perda de expressão de BRCA1 e 34,5% de BRCA2. Embora a IHQ para detecção de BRCA1 com o anticorpo MS110 tenha sido utilizada em 75,5% dos estudos de BRCA1, apenas 42,5% aplicaram o *cut-off* de 10% de células positivas. A perda de expressão de BRCA1 pode ser atribuída a uma variedade de mecanismos, incluindo variantes germinativas ou somáticas e hipermetilação da região promotora do gene e deve apresentar utilidade clínica como biomarcador para a perda de função de BRCA1. Por outro lado, os resultados de BRCA2 indicam limitações dos protocolos de IHQ, dificultando a interpretação dos dados. Em termos da localização da expressão celular de BRCA1 e BRCA2 no câncer epitelial de ovário, a coloração nuclear predomina, enquanto que uma pequena parcela apresenta coloração citoplasmática. Não há nenhuma expressão na membrana celular para os anticorpos anti-BRCA1 ou anti-BRCA2 (AL-KASHWAN; AL-BEDAIRI; AL-MIDHAFFER, 2017; BAI et al., 2014; BALDWIN et al., 2000; CARSER et al., 2011; CHO et al., 2015; FERNÁNDEZ et al., 2017; FURUKAWA et al., 2013; GAN et al., 2013; GÜNEŞ; YILMAZ; UZUNLAR, 2007; HJORTKJÆR et al., 2017; JU et al., 2016; KAERN et al., 2005; KASHIMA et al., 2000; LESNOCK et al., 2013; LI et al., 2017; MCALPINE et al., 2012; MCMILLEN et al., 2012; MEISEL et al., 2014; NOMURA et al., 2016; POPOVSKA et al., 2014; PRADJATMO et al., 2014; PRESS et al., 2008; RADOSA et al., 2011; RUSSELL et al., 2000; SALLUM et al., 2018; SHAWKY et al., 2014; SHILPA et al., 2014; SIRISABYA et al., 2007; SKYTTE et al., 2011; STRICKLAND et al., 2016; SUN et al., 2016; SWISHER et al., 2009; THRALL et al., 2006; VAZ et al., 2007; VORRIUS et al., 2009; WANG C. et al., 2004; WANG et al., 2015a, 2015b; WEBERPALS et al., 2011; YANG et al., 2011b, 2010; YE et al., 2014; ZHANG et al., 2015; ZHENG et al., 2000). As diferentes nomenclaturas do mesmo anticorpo monoclonal anti-BRCA1 comercialmente distribuído por algumas empresas e o mais utilizado no mundo são MS110, OP-92 e Ab-1. Esse anticorpo reage somente com a porção N-terminal, alvo predominantemente nuclear da proteína BRCA1, e é ideal para as amostras FFPE de câncer de mama ou de ovário.(AL-MULLA et al., 2005; BILYK et al., 2012; HASSAN et al., 2008; MILNER et al., 2013; SELVES et al., 2018) No entanto, o MS110 não identifica a proteína BRCA1 no ciclo celular.(MILNER et al., 2013) O método de testagem da recuperação do antígeno para anticorpos anti-BRCA1 aplicáveis produz reações consistentes ao aquecimento, como nas mutações *frameshift* e *nonsense* que resultam em truncamento da proteína BRCA1, podendo

causar imunorreação negativa.(AL-MULLA et al., 2005; BILYK et al., 2012; HASSAN et al., 2008; MILNER et al., 2013; SELVES et al., 2018) Entretanto, as variantes *missense* podem gerar resultados inesperados.(REBBECK et al., 2015)

Há várias formas e cenários para classificar a expressão proteica por IHQ em oncologia.(AL-MULLA et al., 2005; BARTOSCH; CLARKE; BOSSE, 2018; BILYK et al., 2012; HASSAN et al., 2008; HICKS et al., 2017; KUHN; AYHAN, 2018; MIDDHA et al., 2017; MILNER et al., 2013; SELVES et al., 2018) A análise IHQ é amplamente utilizada na prática clínica mundial nos estudos diagnósticos da síndrome de Lynch e tornou-se obrigatória na avaliação da coloração semiquantitativa para marcadores prognósticos e preditivos no câncer de mama.(BARTOSCH; CLARKE; BOSSE, 2018; HICKS et al., 2017; KUHN; AYHAN, 2018; MIDDHA et al., 2017) No primeiro caso, a IHQ investiga os carcinomas endometrioides uterinos, colorretais e ovarianos associados aos defeitos no DNA pelo *mismatch repair* (MMR). Definiu-se como perda da expressão das proteínas MMR a ausência completa da coloração nuclear pela IHQ nas células tumorais, enquanto que os casos positivos são considerados independentemente da intensidade ou porcentagem de núcleos expressos.(MIDDHA et al., 2017). No segundo exemplo, os níveis de expressão do receptor de estrogênio (RE) e do receptor de progesterona (RP) podem variar de baixos (1% a 10%) a altos níveis. No entanto, as recomendações definem um resultado positivo quando a coloração nuclear do RE ou RP ocorre em $\geq 1\%$ das células tumorais mamárias.(HAMMOND et al., 2010; HICKS et al., 2017) Nesta revisão sistemática, os estudos empregaram diferentes anticorpos, sistemas de escores e pontos de corte para a definição de positividade da expressão nuclear das proteínas por IHQ. Diante dos resultados controversos e da inexistência de protocolos padronizados e validados mundialmente para a detecção IHQ da expressão das proteínas BRCA1 e BRCA2 nos carcinomas epiteliais de ovário, assim como o valor prognóstico e preditivo dessas análises, os testes imuno-histoquímicos de BRCA1 e BRCA2 não se encontram disponíveis na prática clínica.(BARTOSCH; CLARKE; BOSSE, 2018; KUHN; AYHAN, 2018) No entanto, de forma geral, o presente estudo revelou problemas desafiadores na avaliação da perda de expressão das proteínas BRCA1 e BRCA2 no câncer epitelial de ovário.

Postulam-se algumas possíveis explicações para a falta de corroboração entre os diversos estudos independentes nesta revisão em relação à técnica da IHQ. Primeiro, os métodos imuno-histoquímicos atualmente empregados para avaliar a expressão de BRCA1 e BRCA2 são heterogêneos. O uso de diferentes métodos de processamento, incluindo as espessuras de corte, tipos de recuperação antigênica, tipos de anticorpos primários, diluições,

tempo e temperatura de incubação, tipo de execução, local da coloração contribuem para os resultados controversos. Essa alta variabilidade da técnica IHQ empregada pode decorrer dos diversos pontos de corte que determinam a ausência ou a redução da coloração, das formas de interpretação dos resultados identificados em cada estudo e dos sistemas de escores para classificar o nível da imunoexpressão das proteínas nas células tumorais com coloração positiva. Esses sistemas de classificação podem se basear em percentagem, intensidade ou ambas. Os resultados conflitantes devem ser interpretados com cautela e mostram a inexistência de protocolos padronizados e validados universalmente quanto à potencialidade do método de detecção IHQ de BRCA1 e BRCA2 na identificação das alterações na expressão dessas proteínas nos carcinomas epiteliais de ovário. Em segundo lugar, o número de estudos que analisou a expressão de BRCA1 é consideravelmente superior ao BRCA2. Terceiro, diversos desses estudos apresentam amostras pequenas, limitando a interpretação dos resultados, outra desvantagem identificada. Quarto, os estudos subestimaram o nível de complexidade biológica molecular e patológica dos casos, não sendo adequadamente avaliados. O método imuno-histoquímico só pode detectar a expressão da proteína e a maioria dos estudos não validou essa técnica. O sequenciamento de DNA ainda é necessário para investigar o status dos genes das pacientes e dos tumores, dados indisponíveis na maioria dos estudos incluídos. Muitas vezes, o conhecimento em relação ao câncer de ovário hereditário baseou-se somente na história familiar oncológica por indisponibilidade de sequenciamento de nova geração. Finalmente, a determinação da imunoexpressão de BRCA1 e BRCA2 como biomarcadores preditores de prognóstico e resposta terapêutica eficientes pelo benefício da quimioterapia baseada em platina e inibidores da PARP nas pacientes com carcinoma epitelial de ovário diverge entre os estudos.

Em relação ao impacto da expressão de BRCA1 e BRCA2 no prognóstico das pacientes com carcinoma epitelial de ovário, muitos estudos incluídos na revisão sistemática de BRCA1 e BRCA2 forneceram dados de SG e SLP. No entanto, a meta-análise foi possível somente para os casos de BRCA1. Quinze estudos observacionais avaliaram a relação prognóstica da expressão de BRCA1 por IHQ. Houve diferença estatística entre os grupos com expressão negativa *versus* positiva tanto na SG quanto na SLP das pacientes a favor daquelas com perda da expressão de BRCA1. Escolheu-se o ponto de corte de 10% como expressão negativa de BRCA1 para a meta-análise dos estudos que possibilitaram essa classificação pelo fornecimento de dados completos das pacientes por escore da IHQ, contabilizando os dados de expressão negativa e equívoca *versus* positiva, e para combiná-los com outros estudos. Para realizar outras análises estatísticas a fim de sintetizar esses dados, a

escolha desse ponto de corte também foi necessária. Nas análises de subgrupo baseadas no subtipo histológico seroso de alto grau de ovário, no tipo de anticorpo MS110 e ponto de corte de 10% para avaliar a imunoexpressão de BRCA1, o resultado da combinação dos estudos mantém esse ganho de sobrevida tanto em SG quanto em SLP. Como esperado, quando foram combinados os estudos de alta qualidade de acordo com avaliação pelas escalas NOS e ELCWP (**Tabela 8**), sugerindo baixo risco de viés de cada estudo, houve redução no valor do HR com os respectivos IC de 95%, no valor de *p* e na heterogeneidade entre os estudos, demonstrando o benefício na sobrevida das pacientes com perda da expressão de BRCA1 por IHQ. Há uma revisão sistemática e meta-análise publicada em 2014 sobre o papel da disfunção de *BRCA1* e *BRCA2*, incluindo alterações germinativas, somáticas e de metilação da região promotora do gene *BRCA1* em câncer epitelial de ovário com relação ao prognóstico.(SUN et al., 2014) Este estudo demonstrou melhora na sobrevida e maior taxa de resposta à platina entre as portadoras de mutações em *BRCA1*.(SUN et al., 2014) No entanto, essa publicação apresentou limitações, uma vez que os dados das pacientes portadoras de variantes germinativas ou somáticas de *BRCA1* foram compilados com os de *BRCA2*. Além disso, esse estudo incluiu os dados de IHQ de apenas sete estudos de BRCA1.(SUN et al., 2014)

A melhora da sobrevida nas portadoras de variantes germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* em relação às não portadoras, e a vantagem prognóstica das *BRCA2* em relação às *BRCA1*, podem estar relacionadas às diferenças biológicas intrínsecas, à resposta inicial a agentes terapêuticos como a platina, ou ambas (BOLTON, 2012; CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015; CASS et al., 2003; CHETRIT et al., 2008; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; KOTSOPOULOS et al., 2016; PENNINGTON et al., 2014; RUBIN et al., 1996; YANG et al., 2011a). Além das diferenças de estágio, grau e histologia (CASS et al., 2003; HUANG, 2018; LEVINE et al., 2002; LIU et al., 2012; YANG et al., 2011a), as portadoras de variantes patogênicas nesses genes poderiam apresentar diferenças em outras características referentes à biologia do tumor que não foram analisadas nos estudos (BOLTON, 2012; CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; PENNINGTON et al., 2014). Como no caso do estudo que mostrou que nas portadoras de variantes germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* diferem entre si dos casos esporádicos quanto à incidência de metástase visceral (GOURLEY et al., 2010); A frequência de tumores de alto grau é maior nos carcinomas serosos relacionados às variantes germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* em comparação aos casos esporádicos. Alterações nesses genes também foram associadas a uma maior taxa de proliferação celular (CHETRIT et al., 2008; LEVINE et al., 2002; RAMUS et

al., 1999; RUBIN et al., 1996). De fato, a redução da expressão de *BRCA1* é uma ocorrência comum no câncer de ovário avançado (ZHENG et al., 2000). Uma maior taxa de proliferação celular e a menor diferenciação celular, em conjunto com a deficiência da recombinação homóloga devido às mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, podem contribuir para uma melhor resposta aos efeitos danosos no DNA da quimioterapia baseada em platina e provavelmente um melhor prognóstico (CASS et al., 2003; LEVINE et al., 2002; LIU et al., 2012; YANG et al., 2011a).

Muitos estudos mostram que a perda de função, redução da expressão ou inativação de *BRCA1* ou *BRCA2* associam-se ao aumento da sensibilidade aos agentes platinantes e aos inibidores da PARP, acarretando em melhor prognóstico (BOLTON, 2012; CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015; CASS et al., 2003; CHETRIT et al., 2008; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; KOTSOPOULOS et al., 2016; PENNINGTON et al., 2014; RUBIN et al., 1996; YANG et al., 2011a). Uma análise agrupada de 26 estudos observacionais estimou a sobrevida de 3.879 pacientes com câncer de ovário. A sobrevida global em cinco anos foi de 36% (34-38%, IC 95%) em não portadoras de variantes germinativas patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*, 44% (40-48%, IC 95%) em *BRCA1* e 52% (46-58%, IC 95%) em *BRCA2*. Em um modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox ajustado apenas para o local do estudo e ano ao diagnóstico, as *BRCA1* apresentam maior sobrevida do que as não portadoras de alterações genéticas (HR=0,78; 0,68-0,89; IC 95% p=0,001). Houve maior favorecimento após ajustar para o estágio, grau, histologia e idade ao diagnóstico (HR=0,73; 0,64-0,84; IC 95% p=0,001). Portadoras de variantes patogênicas em *BRCA2* apresentaram maior sobrevida em comparação às não portadoras (HR=0,61; 0,50-0,76; IC 95% p=0,001), principalmente após ajustar para outros fatores prognósticos (HR=0,49; 0,39-0,61; IC 95% p<0,001) (BOLTON, 2012). Apesar da demonstração de melhor sobrevida de curto prazo em análise agrupada de 27 estudos observacionais em 6.556 pacientes com câncer de ovário portadoras de mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*, esses resultados não foram confirmados com análise de sobrevida em dez anos (CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015). A probabilidade de recidiva tardia assemelha-se entre os grupos, apesar da resposta inicial à platina. Outro estudo evidencia uma maior proporção no número de óbitos precoces entre os casos de câncer de ovário esporádico e a possibilidade de reversão deste padrão após os primeiros anos do diagnóstico (MCLAUGHLIN et al., 2013).

Vários mecanismos podem explicar a observação aparentemente paradoxal do melhor prognóstico nas portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1*. Cânceres ovarianos associados a variantes em *BRCA1* ou *BRCA2*, particularmente *BRCA1*, apresentam idade mais

jovem em comparação aos casos esporádicos. Enquanto a idade precoce ao diagnóstico é um fator prognóstico favorável bem estabelecido, o *status* da portadora de variante germinativa em *BRCA1* ou *BRCA2* permanece um fator prognóstico independentemente significativo após o ajuste para os efeitos da idade (BOLTON, 2012; CANDIDO-DOS-REIS et al., 2015; CASS et al., 2003; CHETRIT et al., 2008; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015; KOTSOPOULOS et al., 2016; PENNINGTON et al., 2014; RUBIN et al., 1996; YANG et al., 2011a). Estudos sugerem que as mutações de reversão nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* podem restaurar a estrutura de codificação, permitindo a expressão da proteína funcional de *BRCA1* ou *BRCA2*, revertendo o benefício na sobrevida ao conferir resistência à platina (SAKAI et al., 2008; SWISHER et al., 2008).

Há algumas limitações neste estudo, apesar do esforço em homogeneizar e equilibrar as diferentes características envolvidas nesta revisão sistemática seguida de meta-análise. Todos os estudos incluídos analisaram a detecção da expressão de *BRCA1*, *BRCA2* ou ambas pela técnica IHQ. No entanto, há diversas diferenças entre os métodos imuno-histoquímicos empregados, tornando-se um desafio propor uma forma de validação dos reagentes e anticorpos utilizados nas reações como forma de garantir a ampla reprodutibilidade do método de coloração e homogeneidade na interpretação dos resultados. Particularmente com relação às diversas técnicas de detecção IHQ empregadas, sugere-se que os principais fatores responsáveis pelos resultados controversos são anticorpo utilizado, recuperação antigênica, a falta de uma padronização universal com relação à coloração nuclear das proteínas *BRCA1* e *BRCA2*.

Vários outros fatores podem explicar as discrepâncias observadas nesta revisão sistemática, dada a complexidade dos múltiplos subtipos de câncer de ovário, diferentes características populacionais, tamanhos amostrais, período, estádios da doença, critérios de inclusão e exclusão comparados entre os estudos. Além disso, a classificação em câncer de ovário esporádico ou hereditário em numerosos estudos baseou-se apenas na história familiar de câncer devido à indisponibilidade de definição do status genético de *BRCA1* ou *BRCA2* das pacientes incluídas na maioria dos estudos. Dois patologistas especialistas e cegos quanto ao perfil fenotípico e genotípico das pacientes avaliaram a maioria dos casos. No entanto, os escores utilizados para definir o nível da expressão de *BRCA1* ou *BRCA2* e interpretar os resultados foram múltiplos e conflitantes.

Outra limitação deste estudo foi a impossibilidade em conduzir a meta-análise das cinco coortes de *BRCA2* diante dos resultados incongruentes da perda de expressão de *BRCA2* por IHQ em relação aos dados publicados da porcentagem de alterações em *BRCA2*

por várias vias. Além disso, outra característica que contribuiu para a exclusão dos estudos de BRCA2 da meta-análise foi a ampla heterogeneidade do método imuno-histoquímico empregado, fornecendo dados impossíveis de serem combinados na condução meta-analítica. Dos cinco estudos de BRCA2, três utilizaram o mesmo tipo de anticorpo, e os outros dois estudos utilizaram outros dois anticorpos anti-BRCA2, sendo que os sistemas de escores utilizados para avaliação da expressão da proteína por IHQ foram divergentes, como mostrado na **Tabela 7**.

Diante de todas essas limitações entre os estudos, há uma necessidade em ampliar a pesquisa translacional. Estudos prospectivos e de validação da análise da expressão de BRCA1 e BRCA2 por IHQ são necessários, assim como a padronização do protocolo metodológico validado. Devem incluir o tipo de anticorpo, reagentes, sistema de classificação e ponto de corte utilizados como forma de garantir uma ampla reprodutibilidade do método de coloração e homogeneidade na interpretação dos resultados, assim como na definição da relação com o prognóstico das pacientes.

Como perspectivas futuras, o método de detecção IHQ de BRCA1 e BRCA2 nos carcinomas epiteliais de ovário pode apresentar utilidade clínica em termos de método para rastreamento da expressão dessas proteínas, associação com as características clínicas, com os subtipos de tumores, prognóstico, resposta à quimioterapia ou resistência ao tratamento. No entanto, o desenvolvimento de novos anticorpos anti-BRCA1 e anti-BRCA2 direcionados a outros epítomos podem melhorar o desempenho da técnica IHQ. Atualmente, a IHQ ainda não é amplamente empregada no cenário clínico devido à necessidade de amplas pesquisas translacionais validadas. Estudos futuros focados na padronização e validação dos métodos imuno-histoquímicos intra e interinstitucionais para a utilização dessa técnica para uso clínico nesses tumores serão fundamentais. Pesquisas adicionais serão necessárias para compreender as vias moleculares subjacentes responsáveis pela associação entre a expressão IHQ de BRCA1 ou BRCA2 no câncer epitelial de ovário, a relevância prognóstica e a aplicabilidade de se atingir o alvo terapêutico nas células cancerígenas que apresentam recorrência ou resistência ao tratamento. De fato, a revisão sistemática da técnica IHQ é exploratória, descritiva e para resolver esses problemas, estudos de validação da IHQ de BRCA1 e BRCA2 devem ser conduzidos com as pesquisas das alterações genômicas e epigenéticas no futuro próximo.

As mudanças recentes no conhecimento do carcinoma epitelial de ovário constituem significativas implicações à pesquisa e à prática clínica.(MAHNER; PFISTERER, 2013) *BRCA1* ou *BRCA2* defeituosos identificados no câncer de ovário (CANCER GENOME

ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KURMAN; SHIH, 2010, 2016; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014) são relevantes em diversos cenários (MAHNER; PFISTERER, 2013). Há grande progresso na compreensão da carcinogênese e do comportamento biológico desses tumores (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2011; KURMAN; SHIH, 2010, 2016; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014). As descobertas abrem janelas de oportunidades para entender o prognóstico e personalizar o tratamento das pacientes com carcinoma epitelial de ovário. Focam nos mecanismos de formação e disseminação do câncer de ovário, e prometem modificar radicalmente a abordagem da doença em termos de prevenção, diagnóstico precoce e desenvolvimento de novas opções terapêuticas, podendo melhorar o prognóstico das pacientes. Por ser uma técnica com custo relativamente reduzido, acessível e de fácil reprodutibilidade, a análise de expressão de BRCA1 por IHQ deveria ser utilizada na prática clínica como marcador prognóstico inicial, preditivo de resposta à quimioterapia, à terapia alvo e como teste de rastreamento para alterações em BRCA1. As platinas e os iPARP são mais eficientes nas pacientes com expressão negativa de BRCA1. A seleção dessas pacientes pode melhorar a sobrevida das mulheres acometidas por esta doença extremamente letal. A integração da análise de expressão IHQ de BRCA1 no sistema de saúde pode ser de grande utilidade em uma variedade de condições. Este estudo pode também contribuir para melhorar os desenhos e os relatos de estudos futuros com potencial diagnóstico, prognóstico e preditivo. Dessa forma, espera-se identificar pacientes com alterações em BRCA1 e BRCA2 por IHQ que farão a diferença na tomada de decisão na prática clínica, podendo resultar em uma abordagem efetiva e individualizada para as pacientes com carcinoma epitelial de ovário.

6 CONCLUSÕES

Os valores clínico-patológico, genético molecular, prognóstico e preditivo das expressões imuno-histoquímicas de BRCA1 e BRCA2 foram estudados em diversos subtipos de carcinomas epiteliais ovarianos.

A IHQ de BRCA1 nos carcinomas epiteliais ovarianos parece ser um método efetivo para identificar a perda de expressão por mecanismos genéticos e epigenéticos e possui valores prognósticos e preditivos de resposta terapêutica.

A IHQ de BRCA2 ainda é ineficiente para identificar a perda de expressão da proteína.

A detecção IHQ de BRCA1 com o anticorpo MS110 foi utilizada em 75,5% dos estudos de BRCA1 e 42,5% desses estudos aplicaram o *cut-off* de 10% de células positivas.

Houve elevada variação nos resultados diante das diferentes abordagens metodológicas imuno-histoquímicas de BRCA1 e BRCA2 nas amostras tumorais das pacientes com carcinoma epitelial de ovário, mostrando a inexistência de padronização universal e validação dessa técnica.

Houve elevada divergência na frequência da expressão deficiente entre os estudos, variando de 6,0% a 88,0% para BRCA1 e de 0,0% a 87,0% para BRCA2. Considerando-se 10% de *cut-off* dentre todos os anticorpos empregados, 47,0% dos casos apresentam perda de expressão de BRCA1 e 34,5% de BRCA2.

Os dados combinados dos estudos indicam que pacientes com tumores com imunoexpressão negativa de BRCA1 associam-se a melhor prognóstico, tanto em sobrevida global quanto em sobrevida livre de progressão.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- AL-KASHWAN, T. A.; AL-BEDAIRI, F. J.; AL-MIDHAFFER, R. H. Significant role of loss or reduced BRCA1 gene expression in clinical implication of ovarian cancer. **Kufa Medical Journal**, v. 17, n. 1, p. 62–76, 2017.
- AL-MULLA, F. et al. BRCA1 gene expression in breast cancer: A correlative study between real-time RT-PCR and immunohistochemistry. **JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY**, v. 53, n. 5, p. 621–629, maio 2005.
- BAI, X. et al. BRCA1 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian carcinoma: Association with low expression of BRCA1, improved survival and co-expression of DNA methyltransferases. **Oncology letters**, v. 7, n. 4, p. 1088–1096, abr. 2014.
- BALDWIN, R. L. et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: A population-based study. **Cancer Research**, v. 60, n. 19, p. 5329–5333, 2000.
- BARTOSCH, C.; CLARKE, B.; BOSSE, T. Gynaecological neoplasms in common familial syndromes (Lynch and HBOC). **Pathology**, v. 50, n. 2, p. 222–237, fev. 2018.
- BILLING, D. et al. The BRCT Domains of the BRCA1 and BARD1 Tumor Suppressors Differentially Regulate Homology-Directed Repair and Stalled Fork Protection. **Molecular Cell**, v. 72, n. 1, p. 127–139.e8, out. 2018.
- BILYK, E. A. et al. [Morphologic and immunohistochemical features of Fallopian tubes and ovaries in women with genetic predisposition to ovarian cancer]. **Voprosy onkologii**, v. 58, n. 4, p. 507–513, 2012.
- BOLTON, K. L. Association Between BRCA1 and BRCA2 Mutations and Survival in Women With Invasive Epithelial Ovarian Cancer. **JAMA**, v. 307, n. 4, p. 382, 25 jan. 2012.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries: Global Cancer Statistics 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 12 set. 2018.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 609–615, 29 jun. 2011.
- CANDIDO-DOS-REIS, F. J. et al. Germline Mutation in BRCA1 or BRCA2 and Ten-Year Survival for Women Diagnosed with Epithelial Ovarian Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 3, p. 652–657, 1 fev. 2015.
- CANNISTRA, S. A. Cancer of the Ovary. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 21, p. 1550–1559, 18 nov. 1993.
- CARSER, J. E. et al. BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to
- 1 De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 123, n. 3, p. 492–498, dez. 2011.
- CASS, I. et al. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 9, p. 2187–2195, 2003.
- CHEN, S.; PARMIGIANI, G. Meta-Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* Penetrance. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 11, p. 1329–1333, 10 abr. 2007.
- CHETRIT, A. et al. Effect of *BRCA1/2* Mutations on Long-Term Survival of Patients With Invasive Ovarian Cancer: The National Israeli Study of Ovarian Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 1, p. 20–25, jan. 2008.
- CHO, D. H. et al. The expression of DBC1/CCAR2 is associated with poor prognosis of ovarian carcinoma. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, n. 1, 2015.
- D'ANDREA, A. D.; GROMPE, M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 23–34, jan. 2003.
- EOH, K. J. et al. Detection of Germline Mutations in Patients with Epithelial Ovarian Cancer Using Multi-gene Panels: Beyond BRCA1/2. **Cancer Research and Treatment**, v. 50, n. 3, p. 917–925, 15 jul. 2018.
- FERNÁNDEZ, A. et al. Expresión de BRCA1 en mujeres con neoplasias epiteliales de ovario del Estado Carabobo, Venezuela. **Revista Venezolana de Oncología**, v. 29, n. 2, p. 112–122, 2017.
- FURUKAWA, N. et al. Evaluation of the BRCA1/2 mutation as a prognostic marker in primary peritoneal serous cancer. **Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 03, n. 09, p. 653–657, 2013.
- GAN, A. et al. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in BRCA-proficient ovarian high-grade serous carcinoma; association with patient survival. **Human Pathology**, v. 44, n. 8, p. 1638–1647, 2013.
- GARG, K. et al. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. **The American journal of surgical pathology**, v. 37, n. 1, p. 138–146, jan. 2013.
- GOURLEY, C. et al. Increased Incidence of Visceral Metastases in Scottish Patients With BRCA1/2-Defective Ovarian Cancer: An Extension of the Ovarian BRCAness Phenotype. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 15, p. 2505–2511, 20 maio 2010.
- GÜNEŞ, N.; YILMAZ, F.; UZUNLAR, A. K. Grading of the ovarian serous cystadencarcinomas, and its correlation with BRCA1 and p53 immunoreactivity. **Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, v. 27, n. 3, p. 335–343, 2007.

- HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784–2795, jun. 2010.
- HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap)—A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 2, p. 377–381, abr. 2009.
- HASSAN, S. et al. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 19–25, fev. 2008.
- HICKS, D. et al. Immunohistochemical Performance of Estrogen and Progesterone Receptor Antibodies on the Dako Omnis Staining Platform: Evaluation in Multicenter Studies. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 25, n. 5, p. 313–319, 2017.
- HIGGINS, J. P. T. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ**, v. 327, n. 7414, p. 557–560, 6 set. 2003.
- HIGGINS, J. P. T.; THOMPSON, S. G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statistics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1539–1558, 15 jun. 2002.
- HJORTKJÆR, M. et al. The prognostic value of BRCA1 and PARP expression in epithelial ovarian carcinoma: Immunohistochemical detection. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 36, n. 2, p. 180–189, 2017.
- HUANG, Y.-W. Association of BRCA1/2 mutations with ovarian cancer prognosis: An updated meta-analysis. **Medicine**, v. 97, n. 2, p. e9380, jan. 2018.
- JU, L.-L. et al. Expression and clinical implication of Beclin1, HMGB1, p62, survivin, BRCA1 and ERCC1 in epithelial ovarian tumor tissues. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 10, p. 1993–2003, 2016.
- KAERN, J. et al. Prognostic factors in ovarian carcinoma stage III patients. Can biomarkers improve the prediction of short-and long-term survivors? **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 6, p. 1014–1022, 2005.
- KASHIMA, K. et al. Screening of BRCA1 mutation using immunohistochemical staining with C- terminal and N-terminal antibodies in familial ovarian cancers. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 91, n. 4, p. 399–409, 2000.
- KONSTANTINOPOULOS, P. A. et al. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 11, p. 1137–1154, 1 nov. 2015.
- KOTSOPOULOS, J. et al. Ten-year survival after epithelial ovarian cancer is not associated

- with BRCA mutation status. **Gynecologic Oncology**, v. 140, n. 1, p. 42–47, jan. 2016.
- KUHN, E.; AYHAN, A. Diagnostic immunohistochemistry in gynaecological neoplasia: a brief survey of the most common scenarios. **Journal of Clinical Pathology**, v. 71, n. 2, p. 98–109, fev. 2018.
- KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory: **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 433–443, mar. 2010.
- KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. **The American journal of pathology**, v. 186, n. 4, p. 733–747, 2016.
- KURNIT, K. C.; COLEMAN, R. L.; WESTIN, S. N. Using PARP Inhibitors in the Treatment of Patients With Ovarian Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 19, n. 12, dez. 2018.
- LEDERMANN, J. A. et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 24, n. suppl 6, p. vi24–vi32, 1 out. 2013.
- LESNOCK, J. L. et al. BRCA1 expression and improved survival in ovarian cancer patients treated with intraperitoneal cisplatin and paclitaxel: A Gynecologic Oncology Group Study. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 6, p. 1231–1237, 2013.
- LEVINE, D. A. et al. Cell proliferation and apoptosis in BRCA-associated hereditary ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 85, n. 3, p. 431–434, 2002.
- LI, M. et al. Characterization of ovarian clear cell carcinoma using target drug-based molecular biomarkers: implications for personalized cancer therapy. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, 10 fev. 2017.
- LIBERATI, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **BMJ**, v. 339, n. jul21 1, p. b2700–b2700, 4 dez. 2009.
- LIU, J. et al. Clinical characteristics and outcomes of BRCA-associated ovarian cancer: genotype and survival. **Cancer Genetics**, v. 205, n. 1–2, p. 34–41, jan. 2012.
- LÖBRICH, M.; JEGGO, P. A. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 11, p. 861–869, nov. 2007.
- MAHNER, S.; PFISTERER, J. Towards individualised treatment in ovarian cancer. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 2, p. 101–102, fev. 2013.
- MATULONIS, U. A. et al. Ovarian cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16061, 25 ago. 2016.

- MCALPINE, J. N. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations correlate with TP53 abnormalities and presence of immune cell infiltrates in ovarian high-grade serous carcinoma. **Modern Pathology**, v. 25, n. 5, p. 740–750, 2012.
- MCGEE, J. et al. 5th Ovarian Cancer Consensus Conference: Individualized Therapy and Patient Factors. **Annals of Oncology**, p. mdx010, 24 jan. 2017.
- MCLAUGHLIN, J. R. et al. Long-Term Ovarian Cancer Survival Associated With Mutation in BRCA1 or BRCA2. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 2, p. 141–148, 16 jan. 2013.
- MCMILLEN, B. D. et al. Expression analysis of MIR182 and its associated target genes in advanced ovarian carcinoma. **Modern Pathology**, v. 25, n. 12, p. 1644–1653, 2012.
- MEINHOLD-HEERLEIN, I.; HAUPTMANN, S. The heterogeneity of ovarian cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 289, n. 2, p. 237–239, fev. 2014.
- MEISEL, J. L. et al. The performance of BRCA1 immunohistochemistry for detecting germline, somatic, and epigenetic BRCA1 loss in high-grade serous ovarian cancer. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 12, p. 2372–2378, 1 dez. 2014.
- MIDDHA, S. et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. **JCO Precision Oncology**, n. 1, p. 1–17, set. 2017.
- MILNER, R. et al. Validation of the BRCA1 antibody MS110 and the utility of BRCA1 as a patient selection biomarker in immunohistochemical analysis of breast and ovarian tumours. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 462, n. 3, p. 269–279, mar. 2013.
- MISTELI, T.; SOUTOGLU, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, abr. 2009.
- MOHER, D. et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, 21 jul. 2009.
- NOMURA, H. et al. Expression of potential biomarkers associated with homologous recombination repair in patients with ovarian or triple-negative breast cancer. **Cancer Biomarkers**, v. 16, n. 1, p. 145–152, 18 jan. 2016.
- OUZZANI, M. et al. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, dez. 2016.
- OXMAN, A. D. Users' Guides to the Medical Literature: I. How to Get Started. **JAMA**, v. 270, n. 17, p. 2093, 3 nov. 1993.

- PARMAR, M. K. B.; TORRI, V.; STEWART, L. Extracting summary statistics to perform meta-analyses of the published literature for survival endpoints. **Statistics in Medicine**, v. 17, n. 24, p. 2815–2834, 30 dez. 1998.
- PENNINGTON, K. P. et al. Germline and Somatic Mutations in Homologous Recombination Genes Predict Platinum Response and Survival in Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 3, p. 764–775, 1 fev. 2014.
- POPOVSKA, S. et al. Morphologically and immunohistochemically based screening criteria for selection of patients with possible mutation of BRCA1 gene in primary ovarian cancer. **Akusherstvo i ginekologija**, v. 53, n. 4, p. 21–28, 2014.
- POVEDA, A.; ROMERO, I. Advanced ovarian cancer: 20 years of ovarian cancer treatment. **Annals of Oncology**, v. 27, n. suppl 1, p. i72–i73, abr. 2016.
- PRADJATMO, H. et al. Methylation Status and Immunohistochemistry of BRCA1 in Epithelial Ovarian Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 21, p. 9479–9485, 28 nov. 2014.
- PRAKASH, R. et al. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 4, p. a016600, abr. 2015.
- PRESS, J. Z. et al. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, dez. 2008.
- RADOSA, M. P. et al. Loss of BRCA1 Protein Expression as Indicator of the BRCAness Phenotype Is Associated With Favorable Overall Survival After Complete Resection of Sporadic Ovarian Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 21, n. 8, p. 1399–1406, nov. 2011.
- RAMUS, S. J. et al. Increased frequency of TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 ovarian tumours. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 25, n. 2, p. 91–96, jun. 1999.
- REBBECK, T. R. et al. Association of Type and Location of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations With Risk of Breast and Ovarian Cancer. **JAMA**, v. 313, n. 13, p. 1347, 7 abr. 2015.
- RICHARDSON, W. S. et al. The well-built clinical question: a key to evidence-based decisions. **ACP journal club**, v. 123, n. 3, p. A12-13, dez. 1995.
- ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68–78, jan. 2012.
- RUBIN, S. C. et al. Clinical and Pathological Features of Ovarian Cancer in Women with Germ-Line Mutations of *BRCA1*. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, p. 1413–1416, 7 nov. 1996.

- RUSSELL, P. A. et al. Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. **International Journal of Cancer**, v. 87, n. 3, p. 317–321, 2000.
- SAKAI, W. et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1116–1120, fev. 2008.
- SALLUM, L. F. et al. BRCA1, Ki67, and β -Catenin Immunoexpression Is Not Related to Differentiation, Platinum Response, or Prognosis in Women With Low- and High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: **International Journal of Gynecological Cancer**, p. 1, fev. 2018.
- SCHARDT, C. et al. Utilization of the PICO framework to improve searching PubMed for clinical questions. **BMC Medical Informatics and Decision Making**, v. 7, n. 1, dez. 2007.
- SELVES, J. et al. Immunohistochemistry for Diagnosis of Metastatic Carcinomas of Unknown Primary Site. **Cancers**, v. 10, n. 4, p. 108, 5 abr. 2018.
- SHAWKY, A. E.-A. et al. No Association between BRCA1 Immunohistochemical Expression and Tumor Grade, Stage or Overall Survival in Platinum-Treated Epithelial Ovarian Cancer Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 10, p. 4275–4279, 30 maio 2014.
- SHILPA, V. et al. BRCA1 promoter hypermethylation and protein expression in ovarian carcinoma—an Indian study. **Tumor Biology**, v. 35, n. 5, p. 4277–4284, maio 2014.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, jan. 2017.
- SIRISABYA, N. et al. Prevalence of BRCA1 expression in epithelial ovarian cancer: Immunohistochemical study. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 90, n. 1, p. 9–14, 2007.
- SKYTTE, A.-B. et al. Identification of BRCA1-deficient ovarian cancers. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 6, p. 593–599, jun. 2011.
- STEELS, E. et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. **The European Respiratory Journal**, v. 18, n. 4, p. 705–719, out. 2001.
- STRICKLAND, K. C. et al. Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 13587–13598, 2016.
- SUN, C. et al. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e95285, 2014.

- SUN, C.-Y. et al. A chemotherapy response classifier based on support vector machines for high-grade serous ovarian carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 3245–3254, 2016.
- SWISHER, E. M. et al. Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance. **Cancer research**, v. 68, n. 8, p. 2581–2586, 15 abr. 2008.
- SWISHER, E. M. et al. Methylation and protein expression of DNA repair genes: association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas. **Molecular cancer**, v. 8, p. 48, 2009.
- TAKAOKA, M.; MIKI, Y. BRCA1 gene: function and deficiency. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 1, p. 36–44, fev. 2018.
- TAN, D. S. P. et al. “BRCAness” Syndrome in Ovarian Cancer: A Case-Control Study Describing the Clinical Features and Outcome of Patients With Epithelial Ovarian Cancer Associated With *BRCA1* and *BRCA2* Mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 34, p. 5530–5536, dez. 2008.
- THRALL, M. et al. BRCA1 expression in a large series of sporadic ovarian carcinomas: A Gynecologic Oncology Group study. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, p. 166–171, 2006.
- TIERNEY, J. F. et al. Practical methods for incorporating summary time-to-event data into meta-analysis. **Trials**, v. 8, n. 1, dez. 2007.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 4, p. 444–457, abr. 2017.
- TURNER, N.; TUTT, A.; ASHWORTH, A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 10, p. 814–819, 2004.
- VAZ, F. H. et al. Familial breast/ovarian cancer and BRCA1/2 genetic screening: The role of immunohistochemistry as an additional method in the selection of patients. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 55, n. 11, p. 1105–1113, 2007.
- VORRIUS, T. R. et al. Immunohistochemical Detection of BRCA-1 and BRCA-2 Expression in Human Breast and Ovarian Tumors. **Journal of Histotechnology**, v. 32, n. 4, p. 202–203, dez. 2009.
- WALSH, C. S. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. **Gynecologic Oncology**, v. 137, n. 2, p. 343–350, maio 2015.
- WANG C. et al. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. **Journal of Pathology**, v. 202, n. 2, p. 215–223, 2004.

- WANG, L. et al. Clinicopathologic features observation of ovarian transitional cell tumors. **Zhonghua bing li xue za zhi Chinese journal of pathology**, v. 44, n. 2, p. 118–122, 2015a.
- WANG, Z. et al. Fibrillin-1, induced by Aurora-A but inhibited by BRCA2, promotes ovarian cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 6670–6683, 2015b.
- WEBERPALS, J. I. et al. Breast cancer 1 (BRCA1) protein expression as a prognostic marker in sporadic epithelial ovarian carcinoma: an NCIC CTG OV.16 correlative study. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 11, p. 2403–2410, 1 nov. 2011.
- WELLS, G. A. et al. **The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses.** Disponível em: <http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- YANG, D. et al. Association of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Survival, Chemotherapy Sensitivity, and Gene Mutator Phenotype in Patients With Ovarian Cancer. **JAMA**, v. 306, n. 14, p. 1557, 12 out. 2011a.
- YANG, F. et al. AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma. **Modern Pathology**, v. 24, n. 6, p. 836–845, 2011b.
- YANG, G. et al. Aurora Kinase A Promotes Ovarian Tumorigenesis through Dysregulation of the Cell Cycle and Suppression of BRCA2. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 12, p. 3171–3181, 15 jun. 2010.
- YE, Q. et al. Development of serous ovarian cancer is associated with the expression of homologous recombination pathway proteins. **Pathology and Oncology Research**, v. 20, n. 4, p. 931–938, out. 2014.
- YOSHIDA, K.; MIKI, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science**, v. 95, n. 11, p. 866–871, nov. 2004.
- ZHANG, M. et al. Risk prediction model for epithelial ovarian cancer using molecular markers and clinical characteristics. **Journal of ovarian research**, v. 8, p. 67, 21 out. 2015.
- ZHENG, W. et al. Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 76, n. 3, p. 294–300, mar. 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) checklist

PRISMA 2009 Checklist

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	

Page 1 of 2

PRISMA 2009 Checklist

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	

From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit: www.prisma-statement.org.

Page 2 of 2

ANEXO B – Registro no National Institute for Health and Research - PROSPERO - International prospective register of systematic reviews

UNIVERSITY of York Centre for Reviews and Dissemination	National Institute for Health Research
PROSPERO International prospective register of systematic reviews	
<hr/>	
The immunohistochemistry expression of BRCA1 and BRCA2 for prognosis in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis <i>Lorena Alves Teixeira, Francisco Jose Candido-dos-Reis</i>	
<hr/>	
Citation Lorena Alves Teixeira, Francisco Jose Candido-dos-Reis. The immunohistochemistry expression of BRCA1 and BRCA2 for prognosis in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. PROSPERO 2017:CRD42017070405 Available from http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO_REBRANDING/display_record.asp?ID=CRD42017070405	

Registro em www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/ sob número CRD42017070405. Disponível em: https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/display_record.php?ID=CRD42017070405.

ANEXO C – Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale Cohort Studies (NOS)**NEWCASTLE - OTTAWA QUALITY ASSESSMENT SCALE
COHORT STUDIES**

Note: A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the Selection and Outcome categories. A maximum of two stars can be given for Comparability

Selection**1) Representativeness of the exposed cohort**

- a) truly representative of the average _____ (describe) in the community*
- b) somewhat representative of the average _____ in the community -
- c) selected group of users eg nurses, volunteers
- d) no description of the derivation of the cohort

2) Selection of the non exposed cohort

- a) drawn from the same community as the exposed cohort*
- b) drawn from a different source
- c) no description of the derivation of the non exposed cohort

3) Ascertainment of exposure

- a) secure record (e.g, surgical records)*
- b) structured interview*
- c) written self report
- d) no description

4) Demonstration that outcome of interest was not present at start of study

- a) yes
- b) no

Comparability**1) Comparability of cohorts on the basis of the design or analysis**

- a) study controls for _____ (select the most important factor) *
- b) study controls for any additional factor* (This criteria could be modified to indicate specific control for a second important factor.)

Outcome**1) Assessment of outcome**

- a) independent blind assessment*
- b) record linkage*
- c) self report
- d) no description

2) Was follow-up long enough for outcomes to occur

- a) yes (select an adequate follow up period for outcome of interest) *
- b) no

3) Adequacy of follow up of cohorts

- a) complete follow up - all subjects accounted for*
- b) subjects lost to follow up unlikely to introduce bias - small number lost - > ____ % (select an adequate %) follow up, or description provided of those lost) *
- c) follow up rate < ____ % (select an adequate %) and no description of those lost
- d) no statement

Wells, G. A, Shea, B., O'Connell, D. et al. The Newcastle-Ottawa scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm 2009 Feb 1

ANEXO D - European Lung Cancer Working Party quality scale for biological prognostic factors for lung cancer (ELCWP)

Except when specified, the attributed value per item is 2 points if it is clearly defined in the article, 1 point if its description is incomplete or unclear and 0 point if it is not defined or is inadequate.

I) Scientific design

1. Study objective definition.
2. Study design: prospective (2 points); retrospective or retrolective (1 point); not defined (0 point).
3. Outcome definition.
4. Statistical considerations: fully reported with a preliminary assessment of the patient/sample number to be included and/or analysed (2 points); patient/sample number to be included and/or analysed justified by the number of studied variables (minimum 10 patients per variable) (1 point); not defined (0 point).
5. Statistical methods and tests description.

II) Laboratory methodology

1. Blinding in the biological assays performance: double-blind (2 points); simple-blind (1 point); unblinded or not defined (0 point).
2. Tested factor description: DNA (types of exons analysed), messenger RNA (complete or partial with description of the primers used), protein (nuclear, cytoplasmic or extracted from cellular components), antibodies (type of tissue or liquid sampled).
3. Tissue sample conservation: either fresh tissue or conservation requiring freezing at $\leq -80^{\circ}\text{C}$ in presence of an anti-RNAase for RNA or free-zing at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ for DNA, protein and serum, or fixation in formol, alcohol or paraffin.
4. Description of the revelation test procedure of the biological factor: PCR with mention of primers, polymerase type, general reaction conditions (concentration of the various reagents, cycle number, duration and temperature of the various steps); DNA-sequencing with the method used, the electrophoresis characteristics (gel composition, duration, temperature and generator voltage) and revelation procedure; reverse transcription (RT) with the transcriptase-reverse type and general conditions of incubation (reagent concentration, temperature and duration); SSCP with the gel composition (acrylamide percentage, glycerol content), other electrophoresis characteristics (duration, temperature and generator voltage), coloration method (the SSCP must be followed by the abnormally migrated fragments sequencing if there is no negative internal control); DGGE with gel composition and gel composition gradient, other electrophoresis characteristics (duration, temperature and generator voltage) and coloration method (the DGGE must be followed by the abnormally migrated fragments sequencing if there is no negative internal control);

restricted fragment length polymorphism (RFLP) with the restriction enzyme type, temperature and incubation time, electrophoresis characteristics (gel composition, duration, temperature and generator voltage), coloration method (the RFLP must be followed by the abnormally migrated fragments sequencing if there is no negative internal control); IHC with the first antibody type and clone identification, second antibody type, reaction characteristics (antibodies concentration, duration and temperature of incubation), colouration method (peroxydase, alkaline phosphatase or chromagenic method), epitope unmasking method in case of fixed tissue, endogenous peroxydase activity inhibition method if the colouration method requires peroxydase; ELISA with the type of antibodies/antigens used, general reaction conditions (reagents concentration, temperature, duration), unspecific sites blockage (type of serum used), colouration and reading methods (fluorometry, spectrophotometry, etc.); Western blot with types of antibodies/antigens used, gel composition, other electrophoresis characteristics (duration, temperature, generator voltage), colouration method; immunoblot with the type of antibodies/antigens used, the type of membrane, other electrophoresis characteristics (duration, temperature, generator voltage), colouration method.

5. Description of the negative and positive control procedures.
6. Test reproducibility control: between investigator's centres if the study is multicentric, or inside the centre if it is unicentric.
7. Definition of the level of positivity of the test (only evaluated in case of IHC): validated (2 points); arbitrary (1 point); not described (0 point).

III) Generalizability

1. Patient selection criteria, including histological type, disease stage and treatment.
2. Patients' characteristics, including histology type, disease stage and treatment.
3. Initial workup.
4. Treatment description.
5. Source of samples.
6. Number of unassessable samples with exclusion causes.

IV) Results analysis

1. Follow-up description, including the number of events.
2. Survival analysis according to the biological marker.
3. Univariate analysis of the prognostic factors for survival: report of the relative risk with the confidence interval (2 points); results without evaluation of the relative risk and its confidence interval (1 point); not reported or inadequate (0 point).
4. Multivariate analysis of the prognostic factors for survival: report of the relative risk with the confidence interval (2 points); results without evaluation of the relative risk and its confidence interval (1 point); not reported or inadequate (0 point).

APÊNDICES

APÊNDICE A – Estratégia de busca no Web of Science até setembro de 2018 com atualizações semanais até junho de 2019.

((fallopian tube) AND (cancer* or neoplas* or carcinoma* or tumor* or tumour* or malignan*) OR (primary peritoneal) AND (cancer* or neoplas* or carcinoma* or tumor* or tumour* or malignan*) OR (ovar*) AND (cancer* or neoplas* or carcinoma* or tumor* or tumour* or malignan*)) AND (("brca*") OR ("brca? protein") OR ("brca? gene") OR ("Breast Cancer Type ? Susceptibility Protein") OR ("Breast Cancer ? Protein") OR ("Breast Cancer? Gene Product")) AND (("IHC*") OR ("immunohistochemi*"))))

APÊNDICE B – Estratégia de busca no MEDLINE via PubMed até setembro de 2018 com atualizações semanais até junho de 2019.

(((((ovarian neoplasm[MeSH Terms]) OR (((((((((((((((Neoplasm, Ovarian) OR Ovarian Neoplasm) OR Ovary Neoplasms) OR Neoplasm, Ovary) OR Neoplasms, Ovary) OR Ovary Neoplasm) OR Neoplasms, Ovarian) OR Ovary Cancer) OR Cancer, Ovary) OR Cancers, Ovary) OR Ovary Cancers) OR Ovarian Cancer) OR Cancer, Ovarian) OR Cancers, Ovarian) OR Ovarian Cancers) OR Cancer of Ovary) OR Cancer of the Ovary)))) OR (((ovarian) OR Ovaries) OR Ovary[MeSH Terms])) AND (((((((((((((((Neoplasms[MeSH Terms]) OR (((((((((((Neoplasia) OR Neoplasias) OR Neoplasm) OR Tumors) OR Tumor) OR Malignancy) OR Malignancies) OR Cancer) OR Cancers)) OR Carcinoma[MeSH Terms]) OR (((((((((((Carcinomas) OR Epithelial Neoplasms, Malignant) AND Malignant Epithelial Neoplasms) AND Epithelial Neoplasm, Malignant) AND Malignant Epithelial Neoplasm) AND Neoplasm, Malignant Epithelial) AND Neoplasms, Malignant Epithelial) AND Epithelial Tumors, Malignant) AND Epithelial Tumor, Malignant) AND Malignant Epithelial Tumor) AND Malignant Epithelial Tumors) AND Tumor, Malignant Epithelial) AND Tumors, Malignant Epithelial)) OR Fallopian Tube Neoplasms[MeSH Terms]) OR (((((((Fallopian Tube Neoplasm) OR Neoplasm, Fallopian Tube) OR Neoplasms, Fallopian Tube) OR Fallopian Tube Cancer) OR Cancer, Fallopian Tube) OR Cancers, Fallopian Tube) OR Fallopian Tube Cancers) OR Cancer of the Fallopian Tube)) OR Peritoneal Neoplasms[MeSH Terms]) OR (((Neoplasm, Peritoneal) OR Neoplasms, Peritoneal) OR Peritoneal Neoplasm)))) AND (((((((Genes, BRCA1[MeSH Terms]) OR (((BRCA1 Genes) OR Gene, BRCA1) OR BRCA1 Gene)) OR BRCA1 Protein[MeSH Terms]) OR (((Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein) OR Breast Cancer 1 Protein) OR Ring Finger Protein 53) OR BRCA1 Gene Product) OR Breast Cancer 1 Gene Product)) OR (((BRCA2 Genes) OR Gene, BRCA2) OR BRCA2 Gene)) OR BRCA2 Protein[MeSH Terms]) OR (((((((FANCD1 Protein) OR Fanconi Anemia Complementation Group D1 Protein) OR Fanconi Anemia Group D1 Protein) OR BRCA2 Gene Product) OR Breast Cancer 2 Gene Product) OR Fanconi Anemia Group D1 Complementing Protein) OR Breast Cancer 2 Protein))) AND ((Immunohistochemistry[MeSH Terms]) OR Immunohistochemistry)

APÊNDICE C – Estratégia de busca no EMBASE via OVID até setembro de 2018 com atualizações semanais até junho de 2019.

('ovary tumor'/exp OR 'ovarian neoplasia' OR 'ovarian neoplasm' OR 'ovarian neoplasms' OR 'ovarian tumor' OR 'ovarian tumour' OR 'ovarium tumor' OR 'ovarium tumour' OR 'ovary neoplasm' OR 'ovary tumor' OR 'ovary tumor treatment' OR 'ovary tumour' OR 'ovary tumour treatment' OR 'epithelial ovarian carcinoma'/exp OR 'fallopian tube cancer'/exp OR 'primary peritoneal carcinoma'/exp OR 'primary peritoneal cancer'/exp OR 'primary peritoneal serous carcinoma'/exp OR 'ovary cancer'/exp OR 'cancer, ovary' OR 'malignant ovary tumor' OR 'malignant ovary tumour' OR 'ovarial cancer' OR 'ovarian cancer' OR 'ovarium cancer' OR 'ovary cancer') AND (brca OR 'tumor suppressor gene'/exp OR 'brca1 gene' OR 'cancer suppressor gene' OR 'cancer suppressor genes' OR 'genes, brca2' OR 'genes, brca1' OR 'genes, suppressor, tumor' OR 'genes, suppressor, tumour' OR 'genes, tumor suppressor' OR 'genes, tumour suppressor' OR 'tumor suppressor gene' OR 'tumor suppressor genes' OR 'tumour suppressor gene' OR 'tumour suppressor genes' OR 'brca1 protein'/exp OR 'brca2 protein'/exp OR 'brca1 associated ring domain protein 1'/exp OR 'brca2 gene'/exp OR 'brca1 protein human'/exp OR 'brca2 protein human'/exp OR 'brca gene'/exp OR 'brca protein'/exp) AND ('immunohistochemistry'/exp OR 'antigen staining' OR 'histochemistry, immuno' OR 'immunohistochemistry' OR 'immunostaining' OR 'staining, antigen' OR immunohistochemistry)

APÊNDICE D – Estratégia de busca no SCOPUS até setembro de 2018 com atualizações semanais até junho de 2019.

((title-abs-key (ovar*)) and ((title-abs-key(cancer*) or title-abs-key (carcinoma*) or title-abs-key (neoplas*) or title-abs-key (malignan*) or title-abs-key (tumor*) or title-abs-key (tumour*)))) or ((title-abs-key ("fallopian tube")) and ((title-abs-key(cancer*) or title-abs-key (carcinoma*) or title-abs-key (neoplas*) or title-abs-key (malignan*) or title-abs-key (tumor*) or title-abs-key (tumour*)))) or (((title-abs-key (cancer*) or title-abs-key (carcinoma*) or title-abs-key (neoplas*) or title-abs-key (malignan*) or title-abs-key (tumor*) or title-abs-key (tumour*)))) and (title-abs-key ("primary peritoneal")))) and ((title-abs-key ("brca*")) or ((title-abs-key ("brca? protein") or title-abs-key ("brca? gene")) or ((title-abs-key ("breast cancer type ? susceptibility protein") or title-abs-key("breast cancer ? protein") or title-abs-key("breast cancer ? gene product")))) and ((title-abs-key("ihc") or title-abs-key("immunohistochemi*"))

APÊNDICE E – Estudos excluídos para a revisão sistemática e razões

Estudo	Revista	Identificador	Razão da exclusão
Aghmesheh (2004)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI:10.1016/j.ygyno.2004.08.035	No IHC
Altaras (2002)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI:10.1006/gyno.2001.6492	No IHC
Bi (2013)	<i>J Ovarian Res</i>	DOI:10.1186/1757-2215-6-89	No enough information
Bruchim (2004)	<i>Int J Gynecol Cancer</i>	DOI:10.1111/j.1048-891X.2004.014208.x	No IHC
Busacca (2012)	<i>J Pathol</i>	DOI:10.1002/path.3979	No OC
Cass (2003)	<i>Cancer</i>	DOI 10.1002/cncr.11310	No IHC
Cass (2005)	<i>Obstet Gynecol</i>	DOI:10.1097/01.AOG.0000187892.78392.3f	No IHC
Clarke (2009)	<i>Mod Pathol</i>	DOI:10.1038/modpathol.2008.191	Duplicate
Darcy (2010)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI:10.1016/j.ygyno.2010.01.048	Not original
Fang (2014)	<i>BMC Cancer</i>	DOI:10.1186/1471-2407-14-188	No enough information
Fedoseienko (2016)	<i>PloS One</i>	DOI:10.1371/journal.pone.0165385	No IHC
Garg (2013)	<i>Am J Surg Pathol</i>	DOI:10.1097/PAS.0b013e31826cabbd	Duplicate
Gau (2015)	<i>Cell Cycle</i>	DOI:10.1080/15384101.2015.1036203	No IHC
George (2011)	<i>J Pathol</i>	DOI:10.1002/path.2927	No OC
Gruessner (2014)	<i>Am J Cancer Res</i>	PMC:3902233	No IHC
Haefner (2016)	<i>Int J Cancer</i>	DOI:10.1002/ijc.29690	Duplicate
Kar (2007)	<i>Cancer Biol Ther</i>	DOI:10.4161/cbt.6.7.4329	No enough information
Kim (2014)	<i>Korean J Pathol</i>	DOI:10.4132/KoreanJPathol.2014.48.5.379	Case report
Lee (2015)	<i>Exp Mol Med</i>	DOI:10.1038/emm.2015.85	No IHC
Levine (2002)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI:10.1006/gyno.2002.6646	No IHC
Li (2007)	<i>Cancer Res</i>	DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-2370	Cell lines
Li (2013)	<i>J Exp Clin Cancer Res</i>	DOI:10.1186/1756-9966-32-102	No IHC
Liu (2014)	<i>Oncol Lett</i>	DOI:10.3892/ol.2014.1929	No enough information
Lowery (2012)	<i>Int J Gynecol Cancer</i>	DOI:10.1097/IGC.0b013e318231f140	No IHC
May (2013)	<i>Neoplasia</i>	DOI 10.1593/neo.121674	No enough information
Mehra (2011)	<i>Mod Pathol</i>	DOI:10.1038/modpathol.2010.171	No OC
Milner (2013)	<i>Virchows Arch</i>	DOI:10.1007/s00428-012-1368-y	Cell lines
Monk (2014)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI.org/10.1016/j.ygyno.2013.10.032	Unanswered email
Muñoz-Repeto (2013)	<i>Histol Histopathol</i>	DOI:10.14670/HH-28.133	No IHC
Ossovskaya (2010)	<i>Genes Cancer</i>	DOI:10.1177/1947601910383418	No IHC
Pennington (2013)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI:10.1016/j.ygyno.2012.12.007	No enough information
Press (2010)	<i>Neoplasia</i>	DOI:10.1593/neo.101044	No IHC
Rao (2002)	<i>Biotechniques</i>	PMID:11962614	Cell lines
Ravid (2000)	<i>Eur J Cancer</i>	DOI:10.1016/S0959-8049(00)00096-4	No IHC

Reyes (2014)	<i>Mod Pathol</i>	DOI:10.1038/modpathol.2013.237	<i>Duplicate</i>
Ross (2013)	<i>Gynecol Oncol</i>	DOI:10.1016/j.ygyno.2013.06.019	<i>No IHC</i>
Russo (2007)	<i>Breast Cancer Res Treat</i>	DOI:10.1007/s10549-006-9456-9	<i>No IHC</i>
Schofield (2000)	<i>The Breast</i>	DOI:10.1054/brst.1999.0090	<i>Case report</i>
Scully (1996)	<i>Science</i>	DOI:10.1126/science.272.5258.123	<i>Cell lines</i>
Sekine (2012)	<i>J Obstet Gynaecol Res</i>	DOI:10.1111/j.1447-0756.2012.01961.x	<i>Duplicate</i>
Shabanizadeh (2013)	<i>Middle East J Cancer</i>	ISSN: 2008-6709	<i>Non-invasive OC</i>
Staff (2014)	<i>Int J Gynecol Pathol</i>	DOI:10.1097/PGP.0b013e31829c673b	<i>No OC</i>
Strathdee (2001)	<i>Am J Pathol</i>	DOI:10.1016/S0002-9440(10)64059-X	<i>No enough information</i>
Sun (2013)	<i>J Natl Cancer Inst</i>	DOI:10.1093/jnci/djt302	<i>Duplicate</i>
Van der Steen (2017)	<i>Int J Gynecol Cancer</i>	DOI:10.1097/IGC.0000000000000933	<i>No IHC</i>
Wang (2016)	<i>Cancer Res</i>	DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-0186	<i>Cell lines</i>
Werness (2000)	<i>J Natl Cancer Inst</i>	PMID:10880552	<i>Case report</i>
Wysham (2012)	<i>PLoS One</i>	DOI:10.1371/journal.pone.0030042	<i>No IHC</i>
Zhang (2005)	<i>Int J Gynecol Cancer</i>	DOI:10.1111/j.1048-891X.2005.15007.x	<i>No IHC</i>
Zhu (2015)	<i>Oncotarget</i>	DOI:10.18632/oncotarget.3428	<i>No OC</i>

Legenda: IHC = imunohistochemistry; OC = ovarian cancer.

APÊNDICE F – Estudos excluídos para a meta-análise e razões

Autor	Ano de publicação	Revista	Identificador	Razão da exclusão
Aghmesheh	2004	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.08.035	No IHC
Al-Kashwan	2017	Kufa Medical Journal	Data not available	No survival
Altaras	2002	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1006/gyno.2001.6492	No IHC
Bai	2014	Oncology Letters	DOI: 10.3892/ol.2014.1878	No survival
Baldwin	2000	Cancer Research	PMID: 11034065	No survival
Bi	2013	Journal of Ovarian Research	DOI: 10.1186/1757-2215-6-89	No survival
Bruchim	2004	Int J Gynecol Cancer	DOI: 10.1111/j.1048-891X.2004.014208.x	No IHC
Busacca	2012	Journal of Pathology	DOI: 10.1002/path.3979	No OC
Cass	2003	Cancer	DOI: 10.1002/cncr.11310	No IHC
Cass	2005	Obstetrics & Gynecology	DOI: 10.1097/01.AOG.0000187892.78392.3f	No IHC
Clarke	2009	Modern Pathology	DOI: 10.1038/modpathol.2008.191	No survival
Darcy	2010	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.01.048	Not original
Fang	2014	BMC Cancer	DOI: 10.1186/1471-2407-14-188	No survival
Fedoseienko	2016	Plos One	DOI: 10.1371/journal.pone.0165385	No IHC
Fernandez	2017	Rev Venez Oncol	Data not available	No survival
Furukawa	2013	Open Journal of Obstetrics and Gynecology	DOI: 10.4236/ojog.2013.39119	HR not possible
Gau	2015	Cell Cycle	DOI: 10.1080/15384101.2015.1036203	No IHC
George	2011	Journal of Pathology	DOI: 10.1002/path.2927	No OC
Gruessner	2014	Am J Cancer Res	PMC: 3902233	No IHC
Güneş	2007	Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi	Data not available	No survival
Haefner	2016	International Journal of Cancer	DOI: 10.1002/ijc.29690	No survival
Ju	2016	European Review for Medical and Pharmacological Sciences	PMID: 27249597	No survival
Kaern	2005	Int J Gynecol Cancer	DOI: 10.1111/j.1525-1438.2005.00185.x	HR not possible
Kar	2007	Cancer Biology & Therapy	DOI: 10.4161/cbt.6.7.4329	No survival
Kashima	2000	Jpn J Cancer Res	DOI: 10.1111/j.1349-7006.2000.tb00959.x	No survival
Kim	2014	The Korean Journal of Pathology	DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2014.48.5.379	Case report
Lee	2015	Experimental & Molecular Medicine	DOI: 10.1038/emm.2015.85	No IHC
Levine	2002	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1006/gyno.2002.6646	No IHC
Li	2007	Cancer Research	DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2370	Cell lines
Li	2013	Journal of Experimental & Clinical Cancer	DOI: 10.1186/1756-9966-32-102	No IHC

Research				
Li	2018	Oncology Letters	DOI: 10.3892/ol.2018.8482	No enough information
Liu	2014	Oncology Letters	DOI: 10.3892/ol.2014.1929	No survival
Lowery	2012	Int J Gynecol Cancer	DOI: 10.1097/IGC.0b013e318231f140	No IHC
May	2013	Neoplasia	DOI: 10.1593/neo.121674	No survival
McAlpine	2012	Modern Pathology	DOI: 10.1038/modpathol.2011.211	No survival
Mehra	2011	Modern Pathology	DOI: 10.1038/modpathol.2010.171	No OC
Meisel	2014	Annals of Oncology	DOI: 10.1093/annonc/mdu461	No enough information
Milner	2013	Virchows Arch	DOI: 10.1007/s00428-012-1368-y	Cell lines
Monk	2014	Gynecologic Oncology	DOI.org/10.1016/j.ygyno.2013.10.032	Unanswered email
Muñoz-Repeto	2013	Histology and Histopathology	DOI: 10.14670/HH-28.133	No IHC
Nomura	2016	Cancer Biomarkers	DOI: 10.3233/CBM-150550	No enough information
Ossovskaya	2010	Genes & Cancer	DOI: 10.1177/1947601910383418	No IHC
Pennington	2013	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.12.007	No enough information
Popovska	2014	Akush Ginekol	PMID: 25510067	No survival
Press	2008	BMC Cancer	DOI: 10.1186/1471-2407-8-17	No survival
Press	2010	Neoplasia	DOI: 10.1593/neo.101044	No IHC
Rao	2002	BioTechniques	PMID: 11962614	Cell lines
Ravid	2000	European Journal of Cancer	DOI: 10.1016/S0959-8049(00)00096-4	No IHC
Reyes	2014	Modern Pathology	DOI: 10.1038/modpathol.2013.237	No survival
Ross	2013	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.06.019	No IHC
Russell	2000	International Journal of Cancer	DOI.org/10.1002/1097-0215(20000801)87:3<317::AID-IJC2>3.0.CO;2-B	No survival
Russo	2007	Breast Cancer Res Treat	DOI: 10.1007/s10549-006-9456-9	No IHC
Schofield	2000	The Breast	DOI: 10.1054/brst.1999.0090	Case report
Scully	1996	Science	DOI: 10.1126/science.272.5258.123	Cell lines
Sekine	2012	The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	DOI: 10.1111/j.1447-0756.2012.01961.x	No survival
Shabanizadeh	2013	Middle East Journal of Cancer	pISSN: 2008-6709	Noninvasive OC
Shawky	2014	Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	DOI.org/10.7314/APJCP.2014.15.10.4275	No enough

Shilpa	2014	Tumor Biol	DOI: 10.1007/s13277-013-1558-5	<i>information No enough information</i>
Sirisabya	2007	J Med Assoc Thai	PMID: 17621726	<i>HR not possible</i>
Skytte	2011	Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica	DOI: 10.1111/j.1600-0412.2011.01121.x	<i>No survival</i>
Staff	2014	International Journal of Gynecological Pathology	DOI: 10.1097/PGP.0b013e31829c673b	<i>No OC</i>
Strathdee	2001	American Journal of Pathology	DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64059-X	<i>No survival</i>
Strickland	2016	Oncotarget	DOI: 10.18632/oncotarget.7277	<i>No enough information</i>
Sun	2013	J Natl Cancer Inst	DOI:10.1093/jnci/djt302	<i>Duplicate</i>
Van der Steen	2017	International Journal of Gynecological Cancer	DOI: 10.1097/IGC.0000000000000933	<i>No IHC</i>
Vaz	2007	Journal of Histochemistry & Cytochemistry	DOI: 10.1369/jhc.7A7209.2007	<i>No survival</i>
Vorrius	2009	Journal of Histotechnology	DOI: 10.1179/his.2009.32.4.202	<i>No survival</i>
Wang	2004	Journal of Pathology	DOI: 10.1002/path.1507	<i>No enough information</i>
Wang	2015	Chinese Journal of Pathology	DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.02.008	<i>No survival</i>
Wang	2016	Cancer Research	DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0186	<i>Cell lines</i>
Werness	2000	Journal of the National Cancer Institute	PMID: 10880552	<i>Case report</i>
Wysham	2012	PLoS ONE	DOI: 10.1371/journal.pone.0030042	<i>No IHC</i>
Ye	2014	Pathology & Oncology Research	DOI: 10.1007/s12253-014-9776-8	<i>No survival</i>
Zhang	2005	International Journal of Gynecological Cancer	DOI: 10.1111/j.1048-891X.2005.15007.x	<i>No IHC</i>
Zheng	2000	Gynecologic Oncology	DOI: 10.1006/gyno.1999.5664	<i>No survival</i>
Zhu	2015	Oncotarget	DOI: 10.18632/oncotarget.3428	<i>No OC</i>

Legenda: IHC= *immunohistochemistry*; OC= *ovarian cancer*.