

1 **UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

2

3

4

5

6

7

8

**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO**

9

**E EXPRESSÃO DA ENZIMA SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO EM**

10

**TUMORES OVARIANOS CÍSTICOS**

11

12

13

14

15

**ROSEKEILA SIMÕES NOMEINI**

16

17

18

**UBERABA - MG**

19

**2007**

20

1 **UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

2

3

4

5 **Produção de Óxido Nítrico e Expressão da Enzima Sintase de Óxido Nítrico**  
6 **em Tumores Ovarianos Císticos**

7

8

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
9 Patologia, área de concentração em “Patologia  
10 Ginecológica e Obstétrica”, da Universidade Federal  
11 do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para  
12 obtenção de Título de Doutor.

13

14

15

Aluna: Rosekeila Simões Nomelini

16

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

17

Co-orientadoras: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Beatriz Martins Tavares Murta

18

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sheila Jorge Adad

19

20

21

**Uberaba - MG**

22

**2007**

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

Catálogo-na-fonte: Biblioteca da UFTM

14

N734p Nomelini, Rosekeila Simões.

15

Produção de óxido nítrico e expressão da enzima sintase de óxido nítrico em tumores ovarianos císticos / Rosekeila Simões Nomelini. – 2007.

16

83f. : tab. ; graf. ; fig.

17

Tese (Doutorado em Patologia Ginecológica) –

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007.

18

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta.

19

1. ÓXIDO NÍTRICO. 2. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE. 3. CÂNCER DE OVÁRIO. I. TÍTULO. II. MURTA, EDDIE FERNANDO CANDIDO.

20

CDU 618.11 - 006

21

1

2Dedico esta tese:

3A Deus,

4Pela vida; pela sabedoria em cada momento deste trabalho; por iluminar os meus

5pensamentos.

6

7À minha família: Pedro e Dilma, Rosemary, Pedro Humberto e Marcos

8Pela presença constante em minha vida; pelo carinho; pelos grandes ensinamentos; pela paz e

9pelo amor sem os quais toda a harmonia durante o trabalho realizado jamais seria alcançada.

10Os ensinamentos de meus pais fundamentados na disciplina e no amor foram pedra

11fundamental durante todo o meu crescimento e refletem todas as conquistas de minha vida.

12

13

14Ao Professor Eddie,

15Pela sábia orientação; pela disposição constante durante todo o trabalho; pela dedicação e

16paciência em acompanhar todos os passos da tese; por mostrar o caminho correto e a melhor

17solução em cada momento de dúvida através de sua grandiosa experiência.

18

19

20

21

1

2 Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

3

especialmente:

4

5 Ao Professor Eddie Fernando Candido Murta, pela presença e atenção, pela grande  
6 dedicação e estímulo à pesquisa, por direcionar de forma harmoniosa todas as etapas deste  
7 trabalho.

8

9 À Professora Beatriz Martins Tavares Murta, pela co-orientação da tese, pelas dosagens de  
10 óxido nítrico intracístico, pela leitura das lâminas da imuno-histoquímica, pela amizade  
11 demonstrada desde o início do trabalho, por disponibilizar todos os recursos da Disciplina  
12 de Farmacologia.

13

14 À Professora Sheila Jorge Adad, pela dedicação na escolha dos melhores cortes  
15 histológicos de todos os casos destinados à imuno-histoquímica, pela co-orientação e  
16 constante ajuda.

17

18 Ao Januário Barbosa dos Santos Júnior, pelo auxílio no transporte do material colhido e  
19 processamento dos fluidos intracísticos, e ao Douglas Cobo Micheli, pela colaboração na  
20 dosagem do NO intracístico.

21

1 À Lívia Carolina de Abreu Ribeiro, pelo auxílio na coleta dos dados.

2

3 À Eliângela de Castro Cobo, e à Luzia Helena Gonçalves dos Santos, pela grande eficiência  
4 e rapidez na realização da técnica imuno-histoquímica.

5 Aos professores do curso de Pós-Graduação em Patologia, pela contribuição ao ensino.

6

7 Às funcionárias do Ambulatório de Oncologia Ginecológica e Mastologia, às secretárias da  
8 Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, pelo apoio e disposição.

9

10 Ao Professor Fernando de Queiroz Cunha (Departamento de Farmacologia, FMRP – USP),  
11 por disponibilizar o anticorpo policlonal anti-NOSi.

12

13 Ao Professor Cléber Sérgio da Silva, por disponibilizar parte do reagente para a imuno-  
14 histoquímica.

15

16 Aos residentes da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, e aos alunos da graduação em  
17 Medicina, pelo companheirismo, pela paciência e auxílio durante a coleta do material às  
18 cirurgias.

19

20 À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foi realizado este trabalho.

21

1           Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à  
2Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio  
3financeiro.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1

2

## 1. INTRODUÇÃO

3

4

### 51.1 CÂNCER DE OVÁRIO – ASPECTOS GERAIS

6

7 O câncer de ovário é uma causa comum de morte entre as neoplasias malignas  
8ginecológicas (RUBIN, 1992). É a oitava neoplasia maligna de maior frequência (sem contar o  
9câncer de pele), e a quinta causa de morte por tumores malignos em mulheres nos Estados  
10Unidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2006). Cerca de três quartos dos tumores malignos  
11de ovário apresenta-se em estadiamentos avançados no momento do diagnóstico inicial. É o  
12câncer ginecológico de maior letalidade (SILVERBERG et al., 1990; LA VECCHIA, 2001;  
13INCA 2006). Sua frequência aumenta a cada década de vida, atingindo pico máximo aos 75  
14anos de idade (YANCIK et al., 1986).

15 Apesar do melhor prognóstico em pacientes que apresentam doença localizada,  
16avaliações retrospectivas demonstram que 50% dessas pacientes sofrem recorrência e vão a  
17óbito, apesar da terapia apropriada. Porém, é provável que a sobrevida das pacientes com doença  
18localizada seja superestimada, talvez pelo estadiamento cirúrgico mal realizado (RUBIN, 1992).

19 A maioria das pacientes se encontra em estadiamentos III e IV (FIGO) no momento do  
20diagnóstico (PETTERSON et al., 1988). Nesses casos, a principal estratégia terapêutica é a  
21cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia (CHRISTIAN & THOMAS, 2001). Apesar  
22dos esquemas quimioterápicos derivados da platina e, mais recentemente, dos taxanes, os  
23resultados do tratamento não têm obtido melhora importante nas últimas décadas (YAWN et al.,

12001). Nos estadiamentos I e II, a sobrevida em 5 anos varia de 80 a 95%, enquanto que nos estadiamentos III e IV, essa percentagem é de apenas 5 a 15% (GALLION et al., 1989; DORUM et al., 1996; YAWN et al., 2001).

4 Portanto, são necessárias novas estratégias de tratamento para complementar a terapêutica do câncer de ovário (CHU et al., 2002).

6

7

## 81.2 HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER DE OVÁRIO

9

10 As neoplasias malignas epiteliais têm origem da superfície epitelial derivada do mesotélio celômico embrionário. Os tumores iniciam seu desenvolvimento como um cisto dentro da cápsula do ovário, onde crescem por um período de tempo desconhecido, antes de adquirir a capacidade de formação de metástases. Aproximadamente 5 a 10% dos tumores em estadiamento aparentemente inicial já apresentam metástases em linfonodos aórticos ou pélvicos. Nas mulheres com doença avançada, cerca de dois terços têm doença metastática nos linfonodos (PIVER et al., 1978; RUBIN, 1992, MURTA et al., 1995).

17 Uma forma importante de disseminação tumoral é a esfoliação. Mesmo nos tumores encapsulados, células neoplásicas podem ser encontradas na cavidade peritoneal, que são distribuídas na cavidade abdominal por meio dos movimentos diafragmáticos e pelo peristaltismo intestinal. Além disso, podem passar através dos canais linfáticos do diafragma, chegando até a cavidade pleural, levando, conseqüentemente, ao derrame pleural (FELDMAN & KNAPP, 1974). A disseminação hematogênica é menos freqüente, e ocorre principalmente no parênquima hepático, cérebro, pulmões em outros sítios (DEUTSCH et al., 1987; LEROUX et al., 1991; CORMIO et al., 2003).

1 O epitélio de superfície ovariana é derivado do epitélio celômico embrionário  
2(AUERSPERG et al., 2001) e participa do mecanismo de ruptura e reparo em ciclos ovulatórios,  
3secretando proteínas líticas e modulando a síntese de matriz extracelular. Além disso, possui  
4receptores para hormônios, fatores de crescimento e citocinas que regulam a diferenciação e o  
5crescimento celular. Esse epitélio tem um papel ativo no mecanismo de rotura folicular; o dano  
6ao ácido desoxirribonucléico (DNA) imposto sobre as células da face epitelial que sobrevivem  
7ao processo de ovulação e proliferam para reparar a rotura seria um fator predisponente (que é  
8potencialmente mutagênico) para o câncer de ovário (MURDOCH & MCDONNEL, 2002).

9 A hipótese de que ovulações contínuas seriam um fator de risco para as neoplasias  
10malignas epiteliais de ovário pode ser explicada devido ao trauma localizado e repetido. Esse  
11evento é seguido de um reparo do epitélio de superfície ovariano no local da rotura folicular  
12(FATHALLA, 1971). O dano celular repetitivo ao epitélio de superfície ovariano e subsequente  
13reparo aumenta a possibilidade da manifestação de anormalidades genéticas. Alguns autores têm  
14demonstrado que a proliferação celular epitelial e a transformação maligna dentro de  
15invaginações epiteliais e cistos de inclusão podem ocorrer como resultado da exposição ao  
16fluido folicular rico em estrogênio durante a ovulação (CASAGRANDE et al., 1979; ORTH et  
17al., 1994). Bechtel & Bonavida (2001) demonstraram um papel potencial dos estrógenos e  
18progesterona na proliferação celular no carcinoma de ovário.

19 O componente familiar é um fator importante e bem definido no câncer de ovário. É  
20interessante que o epitélio de superfície ovariana das mulheres com forte história familiar de  
21câncer de ovário difere não somente geneticamente, mas também fenotipicamente. Mudanças  
22moleculares podem ser precocemente identificadas nas células desse epitélio de ovário de  
23mulheres com câncer de ovário familiar (WONG & AUERSPERG, 2003).

### 11.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE E FATORES PREDITORES DE MALIGNIDADE

2

3 O ovário é um órgão que possui acesso anatomicamente difícil ao exame físico. O toque  
4 vaginal bimanual não é um método que apresenta efetividade satisfatória para identificar casos  
5 suspeitos de câncer ovariano em estádios iniciais, e tumores com o maior diâmetro menor que  
6 5cm podem não ser percebidos pelo ginecologista. Então, a sensibilidade e especificidade do  
7 exame ginecológico para o rastreamento de neoplasias ovarianas são questionáveis (MURTA et  
8 al., 2004; PADILLA et al., 2005).

9

10 Características morfológicas ultrassonográficas podem ajudar no diagnóstico de tumores  
11 ovarianos e na diferenciação entre tumores neoplásicos e não neoplásicos. Cistos com conteúdo  
12 anecóico, paredes finas e uniloculares possuem um risco menor de malignidade, ao contrário dos  
13 cistos com áreas sólidas, septos espessos e vegetações em seu interior (MINARETZIS et al.,  
14 1994, OSMERS et al. 1998). O *color Doppler* pode aumentar a especificidade da ultra-  
15 sonografia transvaginal, sendo que um índice de resistência menor que 0,4 e um índice de  
16 pulsatilidade menor que 1,0 podem ser fatores de predição de malignidade (GUERRIERO et al.,  
17 2003; DASKALAKIS et al. 2004; SZPUREK et al., 2004; GUERRIERO et al., 2005;  
18 SZPUREK et al., 2005). Porém, o diagnóstico precoce de câncer ovariano pela ultrassonografia  
19 ainda é controverso devido à sua baixa prevalência na população geral, dificultando seu  
20 rastreamento (U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2004; FISHMAN et al., 2005).

21

22 Os marcadores tumorais são substâncias relacionadas à presença ou à progressão de um  
23 tumor. O CA - 125 é um biomarcador não específico para o câncer de ovário, podendo estar  
24 elevado no primeiro trimestre da gestação, endometriose, infecções pélvicas e outros tipos de  
25 câncer (RAPKIEWICZ et al., 2004). Mas se associado a outros como o CA - 15.3, CA - 72.4 e  
26 CA - 19.9, pode ter aplicação no manejo de massas anexiais (WOOLAS et al., 1995).

10 CA - 19.9 pode estar elevado no subtipo mucinoso, o beta-hCG pode estar aumentado nos  
2 tumores de origem germinativa e também no coriorcarcinoma (PERKINS et al., 2003). Murta et  
3 al. (2004) demonstraram a validade da associação de ultrassonografia e marcadores tumorais na  
4 identificação de neoplasias ovarianas, melhorando a sensibilidade e a especificidade como fator  
5 preditor de malignidade e conduzindo o cirurgião ao melhor tratamento. Assim, a utilização de  
6 marcadores tumorais tem validade na diferenciação de massas ovarianas benignas e malignas,  
7 além de sugerir o subtipo histológico (TAVARES-MURTA et al., 2007).

8 Uma outra alternativa em estudo é a avaliação do microambiente tumoral intracístico.  
9 CA - 15.3, CA - 125, CA - 19.9 e CEA apresentam alta positividade tanto no soro quanto no  
10 fluido intracístico de pacientes com tumores epiteliais malignos de ovário (CHERCHI et al.,  
11 2002; TAVARES-MURTA et al., 2004).

12 Dessa forma, a associação de exame pélvico, ultrassonografia, *color Doppler* e  
13 marcadores tumorais pode auxiliar no diagnóstico de câncer de ovário, apesar das limitações  
14 desses métodos na diferenciação entre benignidade e malignidade (MURTA & NOMELINI,  
15 2006). Por isso, novos métodos são necessários para o diagnóstico precoce e para a  
16 diferenciação entre as massas ovarianas benignas e malignas.

17

18

#### 19 1.4 ÓXIDO NÍTRICO – CARACTERÍSTICAS GERAIS

20

21 O NO, uma das menores moléculas conhecidas, foi identificado como um mensageiro  
22 biológico em 1987. Desde então, houve um aumento exponencial de investigações científicas  
23 com o intuito de elucidar suas atividades fisiológicas e sua participação em doenças. O NO é  
24 sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, pela ação da enzima sintase de óxido nítrico

1(NOS), que existe em três isoformas, sendo duas dessas constitutivas e uma induzida (XU et al., 2002).

3 A NOS endotelial (NOSe) e a NOS neuronal (NOSn) são consideradas isoformas  
4constitutivas (NOSc). A NOSc é citoplasmática e dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina,  
5produzindo NO em pequenas concentrações e por curtos períodos de tempo em resposta à  
6estimulação física ou de receptores. O NO liberado por esta enzima atua através de mecanismo  
7de transdução com ativação da guanilato ciclase solúvel (GMPc) e está envolvido em várias  
8respostas fisiológicas, como a vasodilatação. A outra isoforma (NOSi), citoplasmática e  $\text{Ca}^{2+}$ -  
9independente, é induzida em macrófagos, células endoteliais e outros tipos celulares após  
10estimulação por lipopolissacarídeo (LPS) ou citocinas como interferon (IFN)- $\gamma$ , fator de  
11necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)- $1\beta$ . O NO, nessas condições, tem sua liberação  
12prolongada e é produzido em maiores concentrações (MONCADA et al., 1991).

13 O NO é um regulador dos processos de homeostase e defesa do hospedeiro. Está  
14envolvido em diversas funções biológicas como relaxamento vascular, neurotransmissão e  
15modulação da resposta imune mediada por células (BRENNAN et al., 1999). Evidências  
16sugerem que o NO e os radicais derivados do metabolismo de oxigênio como os superóxidos  
17são moléculas-chave na patogênese de várias doenças infecciosas (AKAIKE & MAEDA,  
182000). Neste contexto, tem sido demonstrado em animais e em humanos que doenças como  
19artrites, glomerulonefrites, endotoxemia e sepse, dentre outras formas de inflamação aguda e  
20crônica, estão associadas ao aumento da produção de NO e regulação crescente da NOSi  
21(MILES et a., 1995).

22 Vários estudos sugerem um importante papel do NO na fisiologia ovariana. Foi  
23demonstrado que o mediador pode ser sintetizado localmente pelo ovário e pode desempenhar

1um papel no desenvolvimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (REIS et al.,  
22000).

3

4

### 51.5 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA CARCINOGENESE

6

7 O NO é uma molécula sinalizadora biológica que atua como mediador, dentre várias  
8funções, de efeitos citotóxicos e citostáticos do sistema imune contra infecções e tumores  
9(CHHATWAL et al., 1996). Porém, quando produzido por longo período de tempo, o excesso  
10de NO poderia levar a mutações e ao câncer (OHSIMA et al., 1994; SHI et al., 2000). Como o  
11NO possui um elétron não pareado e é um radical livre, possui capacidade de promover  
12rápidas reações com outras moléculas, e como conseqüência podem ser formadas moléculas  
13tóxicas (peroxinitritos) que podem causar danos diretos ou indiretos ao DNA. Portanto, o NO  
14pode ser considerado potencialmente mutagênico e carcinogênico (RIEDER et al., 2000). O  
15principal mecanismo pelo qual as células endoteliais ativadas por citocinas lisam células  
16tumerais está associado com a produção de NO (LI et al., 1991).

17 O NO parece apresentar um duplo papel no desenvolvimento tumoral, podendo ter  
18atividade tumoricida ou estar associado ao crescimento tumoral. A atividade da NOSi foi  
19avaliada no tecido ou em células supernadantes de ascite de pacientes com neoplasia maligna  
20de ovário, encontrando-se baixa atividade da enzima em tumores pobre ou moderadamente  
21diferenciados, e uma maior atividade em tumores bem diferenciados e *borderline*.  
22(THOMSEN et al., 1998). Os efeitos aparentemente opostos do NO têm sido atribuídos a  
23muitos fatores como diferenças na isoforma das enzimas NOS, níveis de expressão, linhagens  
24celulares ou tecidos tumorais heterogêneos (XIE & FIDLER, 1998).

1 Tanto a produção de NO quanto a citotoxicidade foram totalmente inibidos pela adição  
2 de um inibidor específico de NOS, sugerindo que macrófagos ativados podem mediar a  
3 citotoxicidade NO-dependente. Portanto, a modulação da expressão do gene NOS pode ser  
4 manipulada para controlar o crescimento de tumores e metástases (SHI et al., 2000 ). Além  
5 disso, a inibição crônica da síntese de NO com N-monometil-L-arginina (L-NMA) levou a um  
6 aumento do crescimento tumoral e retardou o reconhecimento imune em camundongos,  
7 sugerindo um papel do NO endógeno na diminuição da proliferação das células tumorais  
8 (YIM et al., 1993). Por outro lado, quando células tumorais estimuladas por citocinas foram  
9 administradas em camundongos, o L-NMA diminuiu o tamanho do tumor subcutâneo e o  
10 número de metástases pulmonares para níveis semelhantes aos controles, o que sugere que a  
11 produção de NO pelas células tumorais foi responsável pelo desenvolvimento tumoral  
12 (EDWARDS et al., 1996).

13 O NO pode exercer efeitos anti-tumorais, tais como a inibição da respiração  
14 mitocondrial e a supressão da síntese de DNA. Além disso, a síntese de NO por células  
15 tumorais pode ser prejudicial para a sua própria sobrevivência, devido à apoptose mediada pelo  
16 mesmo (RIEDER et al., 2001). Alguns estudos mostram que o NO pode regular a expressão de  
17 alguns genes que participam na sinalização intracelular envolvendo citocinas reguladoras, que  
18 modificam a resposta celular ao estímulo apoptótico. Contudo, a regulação de genes  
19 associados à apoptose não é completamente entendido. Garbán & Bonavida (2001)  
20 demonstraram que a sensibilização mediada por IFN- $\gamma$  em carcinoma ovariano humano de  
21 linhagem celular AD10 levou essas células à citotoxicidade por TNF- $\alpha$ , o que foi devido,  
22 em parte, à geração de NO. Rao et al. (2002) mostraram o potencial quimiopreventivo dos  
23 inibidores seletivos de NOS, associados ou não a inibidores seletivos da COX-2.

1 Também tem sido demonstrado um efeito modulador do NO sobre a atividade de  
2 drogas quimioterápicas, como a cisplatina. Infelizmente, as moléculas liberam-no  
3 indiscriminadamente, e não como alvo preferencial sobre as células tumorais  
4 (BRAUNSCHWEIGER et al., 1996; CANTUARIA et al., 2000). Cantuaria et al. (2000)  
5 demonstraram que a conjugação do NO à glicose poderia exibir substancial aumento da  
6 citotoxicidade em carcinoma ovariano *in vitro*. Sabe-se que células neoplásicas malignas  
7 podem exibir taxas aumentadas do metabolismo da glicose e expressão aumentada do  
8 transporte de glicose e do transporte de RNA-mensageiro. A atividade citotóxica induzida por  
9 NO *in vitro* é dependente de vários fatores, incluindo sensibilidade celular intrínseca. A  
10 conjugação do açúcar para aumentar o efeito terapêutico não é uma estratégia nova. O  
11 quimioterápico Ifosfamida conjugado à glicose é mais tumor-específico do que quando essa  
12 droga é utilizada isoladamente (POHL et al., 1995).

13 Uma interrogação permanece sobre a natureza benéfica ou maléfica ao hospedeiro da  
14 produção de NO em grande quantidade seguida da indução do gene NOS. Por outro lado, a  
15 produção de NO pelas células tumorais promove angiogênese, promovendo o fluxo sanguíneo  
16 tumoral dentro da microvasculatura, essencial no crescimento e manutenção do tumor, e pode  
17 aumentar o comportamento metastático do tumor (ANDRADE et al., 1992; CHU et al., 1998).  
18 Em contraste, efeitos do NO endógeno mostram propriedades benéficas na defesa contra o  
19 crescimento tumoral e metástases (RIEDER et al., 2000). Neste contexto, a expressão da  
20 enzima NOS em células tumorais tem sido implicada como um importante fator de risco para  
21 metástases (SHI et al., 2000). Em câncer de ovário, foi observada uma correlação entre o  
22 número de macrófagos teciduais e a biossíntese de NO. É provável que a NOSi detectada em  
23 tumores ovarianos seja expressa por células imunes presentes no tecido tumoral ovariano  
24 (THOMSEN et al., 1998).

1 Rieder *et al.* (2000) demonstraram que o NO produzido por carcinomas ovarianos está  
2 correlacionado à intensidade da morte celular programada. Essa molécula tem sido  
3 identificada como um segundo-mensageiro baseado em sua habilidade de interagir  
4 quimicamente com proteínas reguladoras (GARBÁN & BONAVIDA, 2001).

5 É, portanto, necessário uma investigação adicional sobre o papel da NOSi no câncer de  
6 ovário para o desenvolvimento de opções terapêuticas adicionais.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1

2

3

## 2. HIPÓTESES

4

5

1. As neoplasias malignas de ovário possuem um maior nível de expressão da enzima NOSi e níveis mais altos de produção de NO no líquido intracístico tumoral quando comparadas com neoplasias benignas e tumores não neoplásicos.

8

9

10

11

2. Os níveis de metabólitos de óxido nítrico, bem como a expressão da enzima NOSi, estão relacionados com o grau de diferenciação e com o estadiamento tumoral nas neoplasias malignas de ovário.

12

13

14

15

16

3. A produção do NO tecidual e do NO intracístico tumoral é realizada em locais distintos e por diferentes tipos celulares.

17

18

19

1

2

### 3. OBJETIVOS

3

4 1. Verificar a expressão da enzima NOSi no tecido de tumores não neoplásicos,  
5 neoplasias benignas e malignas primárias de ovário.

6

7 2. Quantificar os níveis de metabólitos de NO em tumores ovarianos e avaliar se  
8 existem diferenças de seus níveis entre tumores não-neoplásicos, neoplasias  
9 benignas e neoplasias malignas primárias de ovário.

10

11 3. Investigar a relação da expressão da enzima NOSi com o estadiamento e grau  
12 de diferenciação tumoral nas neoplasias malignas de ovário.

13

14 4. Investigar a relação dos metabólitos de NO com estadiamento e grau de  
15 diferenciação tumoral nas neoplasias malignas de ovário.

16

17 5. Correlacionar a produção de NO intracístico com a expressão da enzima NOSi  
18 tecidual em tumores ovarianos.

1

2

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

3

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Pacientes

6 Foram avaliadas 63 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da  
7 Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia / Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da  
8 Universidade Federal do Triângulo Mineiro, submetidas a tratamento cirúrgico de acordo com  
9 critérios pré-estabelecidos, no período de fevereiro de 1996 a fevereiro de 2007. Os critérios  
10 de indicação de laparotomia exploradora foram: cistos anecóicos com diâmetro máximo  
11 menor que 7cm e com persistência da alteração por mais que 6 meses e marcadores tumorais  
12 normais; marcadores tumorais alterados; cistos anecóicos com diâmetro máximo maior ou  
13 igual a 7cm; massas ovarianas com conteúdo sólido, presença de vegetação intracística, septos  
14 grossos, 2 ou mais septos finos; *color Doppler* com índice de resistência menor ou igual a 0,4  
15 (MURTA et al., 2004; MURTA & NOMELINI, 2006).

16 As pacientes foram divididas em grupos, de acordo com o diagnóstico anátomo-  
17 patológico, desta forma: o primeiro grupo de tumores ovarianos não neoplásicos (n=15), o  
18 segundo grupo de neoplasias ovarianas benignas (n=28), e o último grupo de neoplasias  
19 ovarianas malignas primárias (n=20). Os casos *borderline* foram incluídos no grupo de  
20 malignos. As características das pacientes do estudo estão demonstradas na tabela 1.

21

22

1  
2  
3  
4  
56 **Tabela 1:** Características gerais dos grupos de pacientes.

	<b>Tumores não neoplásicos (n = 15)</b>	<b>Neoplasias benignas (n = 28)</b>	<b>Neoplasias malignas (n = 20)</b>
<b>Idade / anos (média, DP)</b>	42,8 ± 7	37,1 ± 14,6	46,9 ± 14,9
<b>Paridade (média, DP)</b>	2,3 ± 1,5	2 ± 1,8	3,1 ± 2,8
<b>Fumantes</b>	4 (26,7%)	7 (25%)	9 (45%)
<b>Raça</b>			
<b>Mulheres brancas</b>	12 (80%)	17 (60,7%)	17 (85%)
<b>Mulheres não brancas</b>	3 (20%)	11 (39,3%)	3 (15%)
<b>Contracepção hormonal</b>	2 (13,3%)	5 (17,9%)	2 (10%)
<b>Ligadura tubária</b>	3 (20%)	3 (10,7%)	4 (20%)
<b>Status hormonal</b>			
<b>Idade reprodutiva</b>	12 (80%)	23 (82,1%)	10 (50%)
<b>Menopausa</b>	3 (20%)	5 (17,9%)	10 (50%)

7

8

9       O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade  
10 Federal do Triângulo Mineiro (Anexo A). Consentimento livre e esclarecido por escrito foi  
11 obtido de cada paciente ou de seus familiares.

12

13

14

15

1        **4.1.2 Critério de inclusão**

2        Diagnóstico pós-operatório de tumor não neoplásico ou neoplásico primário de ovário  
3(benigno ou maligno) pelo anátomo-patológico em parafina.

4

5        **4.1.3 Critérios de exclusão**

6        a) Presença de torção do pedículo anexial;

7        b) Rotura do cisto durante o procedimento cirúrgico;

8        c) Neoplasia maligna secundária de ovário (metástase);

9        d) Tratamento prévio à cirurgia (Quimioterapia).

10

11

12

13

14

15

16

17

## 14.2 MÉTODOS

### 2      **4.2.1 Modelo de estudo**

3      Estudo prospectivo.

4

### 5      **4.2.2 Coleta do líquido intracístico**

6      Todos os tumores ovarianos das pacientes submetidas a laparotomia exploradora com  
7 massa ovariana cística, ou sólida com áreas císticas, foram submetidos à punção,  
8 imediatamente após a exérese do cisto, para a obtenção de 20ml do conteúdo intracístico para  
9 a avaliação do microambiente tumoral. Foram utilizadas seringas de 20ml e agulhas 18G x  
10 11,2; 1,2 x 40, estéreis, e o líquido coletado por aspiração lenta foi colocado em 2 frascos  
11 estéreis, em caixa de isopor com gelo para o transporte até o laboratório da Disciplina de  
12 Farmacologia. O líquido intracístico ovariano foi a seguir centrifugado (1500 rpm, 10 min) e o  
13 sobrenadante coletado foi estocado (- 20°C) até o experimento para a quantificação de  
14 metabólitos de NO (TAVARES-MURTA et al., 2004).

15

16

17

18

19

### 14.2.3 Anátomo-patológico

2 Foi realizado estudo anátomo-patológico dos cortes embebidos em parafina pelo  
3 Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Escola - UFTM, sendo que os casos foram  
4 revisados por um único observador da Disciplina de Patologia Especial do Departamento de  
5 Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

6 A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de  
7 acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (SEROV et al., 1973) e  
8 *International Federation of Gynaecology na Obstetrics* – FIGO (FIGO, 1971) (Anexos B e C).

9 Todos os dados clínicos, laboratoriais e histológicos foram arquivados em banco de  
10 dados específico para o estudo.

11

### 124.2.4 Dosagem de Metabólitos de NO

13

14 A quantificação do nitrato foi determinada através da redução enzimática do nitrito  
15 com a nitrato redutase, conforme descrito (SCHMIDT et al., 1989). As amostras (40 µL)  
16 foram incubadas com o mesmo volume de tampão redutase (fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5;  
17 contendo 1 mM de NADPH, 10 mM de FAD e 4UI de nitrato redutase/mL) durante 20 h a  
18 37°C. Uma curva padrão de nitrato foi determinada por incubação de nitrato sódico (10 a  
19 200 µM) com tampão. A quantidade total de metabólitos de NO foi então determinada pelo  
20 ensaio colorimétrico baseado na reação de *Griess* (GREEN et al., 1981). A absorbância foi  
21 medida a 546 nm. Os resultados foram expressos como µM de  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ .

#### 14.2.5 Detecção da enzima NOS

2

3 Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica foram processados em parafina. Os  
4 casos que preencheram os critérios após o estudo pela técnica de Hematoxilina-eosina foram  
5 revisados por patologista experiente e os blocos dos casos escolhidos foram submetidos a  
6 novos cortes com 4 µm de espessura, em lâminas silanizadas (ATPS - Silano, Sigma®  
7 A3648), empregando-se a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase.

8 As lâminas permaneceram na estufa a uma temperatura de 56°C por um período de 24  
9 horas, e em seguida foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo cerca de 5  
10 minutos em cada, e desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%,  
11 cerca de 10 segundos em cada.

12 Posteriormente, as lâminas permaneceram em um banho de solução salina  
13 tamponada, o PBS (pH 7,2), durante 5 minutos, para hidratação. Logo depois, o excesso de  
14 tampão foi removido e a borda do corte seca, cuidadosamente, com papel absorvente. As  
15 lâminas foram colocadas em uma bandeja, foi adicionada água oxigenada a 3% sobre cada  
16 corte, durante 10 minutos, para ocorrer o bloqueio da peroxidase endógena. Novamente, foi  
17 realizada a lavagem em PBS.

18 A seguir, foi realizada a recuperação dos antígenos. As lâminas foram colocadas em  
19 tubos de citologia contendo solução tampão Citrato 10mM (pH 6,0), que foram vedados com  
20 papel alumínio e colocados dentro de uma panela a vapor (ARNO®) durante 30 minutos a uma  
21 temperatura de 100°C. Então, os tubos foram retirados de dentro da panela e colocados sobre a  
22 bancada para seu resfriamento. Após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas em 3

1 banhos de tampão PBS e incubadas com o anticorpo primário em torno de 18 horas, em  
2 câmara úmida, com temperatura de 3 a 4°C.

3 O anticorpo foi diluído em soro de albumina bovina (Sigma®) de acordo com as  
4 indicações presentes em suas especificações. Essas preparações de albumina bovina (BSA a  
5 52%) e anticorpo primário permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir coloração  
6 de fundo.

7 Após a incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo primário (*Santa Cruz*  
8 *Biotechnology rabbit polyclonal IgG* 100µg/ml, diluição 1:200), as lâminas foram colocadas  
9 em temperatura ambiente, em torno de 15 minutos, lavadas em PBS e secas, como  
10 anteriormente. O anticorpo secundário biotilado (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*)  
11 foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos, em temperatura ambiente, em câmara úmida.  
12 Em seguida, ocorreram lavagens em PBS, e as lâminas foram secas. O complexo  
13 estreptoavidina peroxidase (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*) foi adicionado por 30  
14 minutos nas mesmas condições acima.

15 Após lavagem em PBS, as lâminas foram reveladas, através da adição de uma solução  
16 cromógena, o Diaminobenzidine (DAB) (*Dako Cytomation Liquid DAB and substrate*  
17 *Chromogen System*), por 5 minutos. Concluído o tempo, as lâminas foram lavadas em água  
18 corrente e contra-coradas em hematoxilina de Harris.

19 Finalmente, as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10  
20 segundos cada, para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol,  
21 por 5 minutos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com *entellan* para  
22 posterior análise.

23 As soluções e tampões utilizados constam no anexo D.

1           Foram utilizados controles positivo e negativo. Dois observadores avaliaram as  
2 lâminas. A intensidade de marcação foi avaliada subjetivamente utilizando-se 0 a 3: 0  
3 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação forte) (Figuras  
4 a 4) (ÖZEL et al., 2006).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

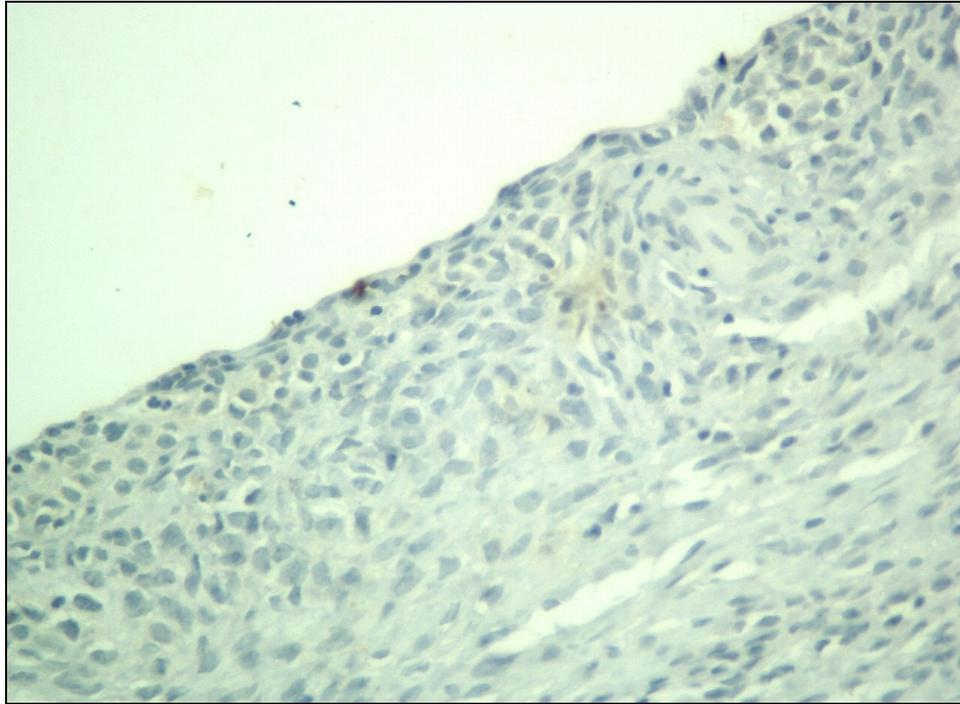
21

22

23

24

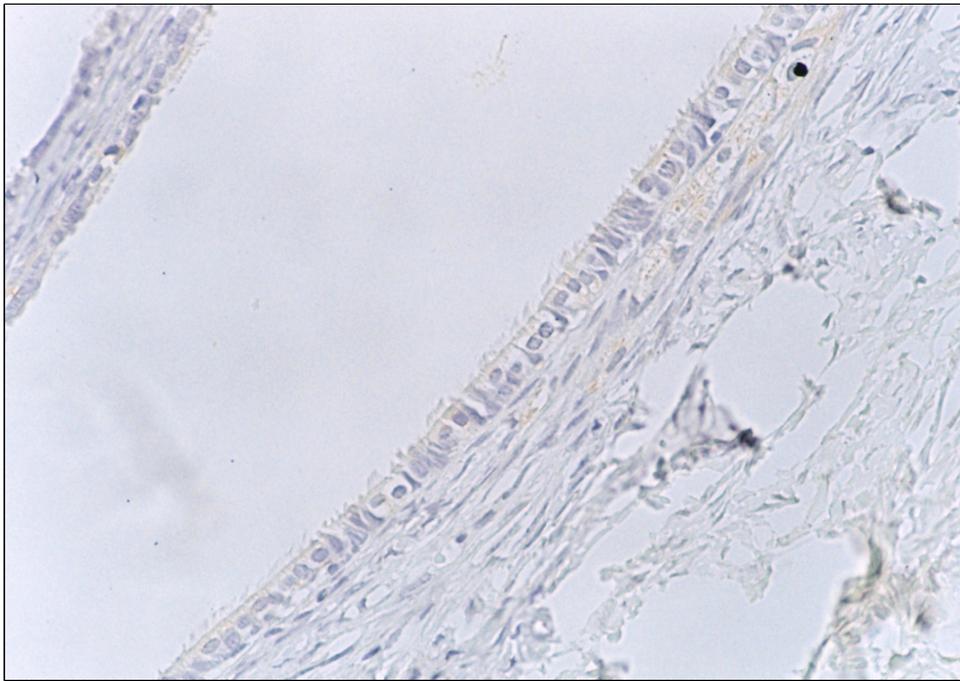
1



2 Figura 1: Marcação imuno-histoquímica 0 de anticorpo policlonal anti-NOSi (400X).

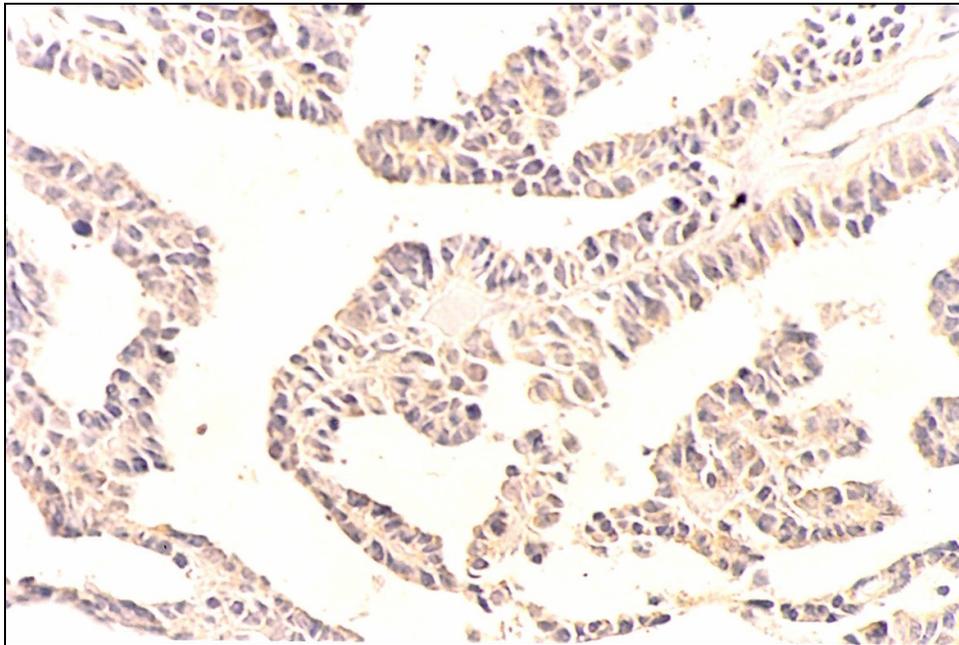
3

4



5 Figura 2: Marcação imuno-histoquímica 1 de anticorpo policlonal anti-NOSi (400X).

1

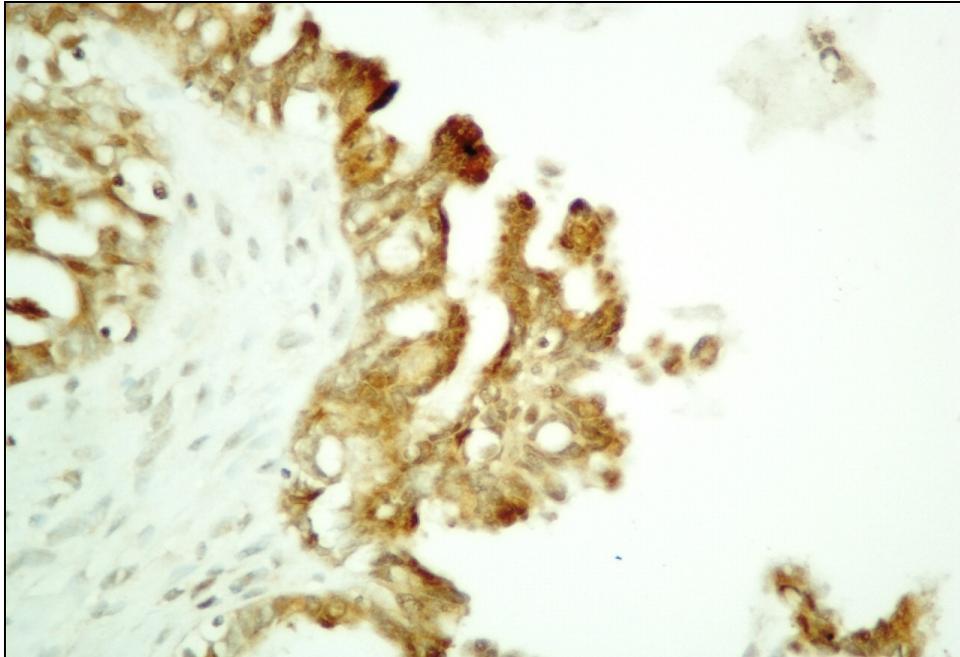


2

Figura 3: Marcação imuno-histoquímica 2 de anticorpo policlonal anti-NOSi (400X).

3

4



5

Figura 4: Marcação imuno-histoquímica 3 de anticorpo policlonal anti-NOSi (400X).

6

7

#### 14.2.6 Banco de dados

2 Os dados clínicos, laboratoriais e cirúrgicos das pacientes estudadas foram arquivados  
3 em banco de dados específico para o estudo. Foram utilizados o Microsoft Excel<sup>®</sup> e Microsoft  
4 Word<sup>®</sup>.

5

#### 64.2.7 Análise Estatística

7 Os dados foram analisados pelo *GraphPad Instat software*. A concordância entre dois  
8 observadores do estudo imuno-histoquímico foi realizado através do *kappa*:  $\kappa < 0,40$ :  
9 concordância fraca;  $0,4 \leq \kappa < 0,8$ : concordância moderada;  $0,8 \leq \kappa < 1,0$ : concordância forte;  
10  $\kappa = 1,0$ : concordância perfeita (ARANGO, 2001). A primeira taxa de concordância entre os  
11 observadores foi de 90,7% ( $\kappa = 0,94$ ). Todos os casos discordantes foram reavaliados e o  
12 resultado foi definido por consenso.

13 Teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os resultados obtidos por imuno-  
14 histoquímica para NOSi e para avaliar a relação da expressão de NOSi e dos níveis de  
15 metabólitos do NO com o estadiamento e o grau de diferenciação tumoral. Dados dos níveis  
16 de metabólitos de NO foram expressos por média e desvio-padrão, e os valores foram  
17 comparados por ANOVA, seguido do teste de Tukey para comparações individuais. A  
18 correlação entre os níveis de NO intracístico e a marcação imuno-histoquímica da enzima  
19 NOSi tecidual foi avaliada pelo Teste de correlação de *rank* de Spearman. Foram considerados  
20 significativos os valores de *p* menor que 0,05.

21

#### **14.2.8 Redação do texto**

2 A redação do texto foi confeccionada seguindo as normas técnicas da Associação  
3 Brasileira de Normas Técnicas.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

## 5. RESULTADOS

1

2

### 35.1 Caracterização dos tumores

4

5 As tabelas 2, 3 e 4 mostram os subtipos histológicos de tumores não neoplásicos,  
6 neoplasias benignas e neoplasias malignas, respectivamente. A tabela 5 mostra a distribuição  
7 dos estadiamentos das neoplasias malignas de ovário.

8

9

10

11

12 **Tabela 2.** Distribuição dos tumores não neoplásicos de acordo com o diagnóstico  
13 histopatológico.

<b>Tumores não neoplásicos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Cistos serosos</b>	10	66,7
<b>Cistos funcionais</b>	5	33,3
<b>Total</b>	15	100

14

15

16

17

18

19

1Tabela 3. Distribuição das neoplasias benignas de ovário segundo o diagnóstico  
2histopatológico.

<b>Neoplasias benignas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Cistoadenoma seroso</b>	11	39,3
<b>Cistoadenoma mucinoso</b>	6	21,4
<b>Teratoma cístico</b>	6	21,4
<b>Cistoadenofibroma seroso</b>	3	10,7
<b>Cistoadenoma sero-mucinoso e tumor de Brenner</b>	1	3,6
<b>Cistoadenoma mucinoso e tumor de Brenner</b>	1	3,6
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

3

4

5Tabela 4. Distribuição das neoplasias malignas de ovário segundo o diagnóstico  
6histopatológico.

<b>Neoplasias malignas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Cistoadenocarcinoma seroso</b>	7	35
<b>Tumor de células da granulosa tipo adulto</b>	4	20
<b>Cistoadenoma mucinoso <i>borderline</i></b>	3	15
<b>Cistoadenocarcinoma mucinoso</b>	2	10
<b>Adenocarcinoma endometrióide</b>	1	5
<b>Teratoma imaturo com carcinoma epidermóide</b>	1	5
<b>Adenocarcinoma pouco diferenciado</b>	1	5
<b>Cistoadenoma seroso <i>borderline</i></b>	1	5
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

7

8

9

10

11 Tabela 5. Distribuição das neoplasias malignas de ovário conforme o estadiamento.

<b>Estadiamento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>IA</b>	5	25
<b>IB</b>	1	5
<b>IC</b>	2	10
<b>IIIA</b>	1	5
<b>IIIC</b>	10	50
<b>IV</b>	1	5
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

12

## 15.2 Marcação imuno-histoquímica para a enzima NOSi

2

3 Houve amostras suficientes para o estudo imuno-histoquímico de 15 tumores não-  
4neoplásicos, 21 neoplasias benignas e 18 neoplasias malignas.

5

6 Os resultados da marcação imuno-histoquímica estão demonstrados na tabela 6.  
7Marcação  $\leq 1$  foi considerada fraca intensidade e marcação  $\geq 2$  foi considerada forte  
8intensidade. Marcação forte de NOSi foi significativamente mais freqüente em câncer de  
9ovário comparado com tumores não neoplásicos ( $p = 0,0014$ ) e neoplasias benignas ( $p =$   
100,0003).

11

12

13

14

15**Table 6.** Marcação imuno-histoquímica de NOSi em tumores não neoplásicos, neoplasias  
16benignas e neoplasias malignas de ovário.

	Forte intensidade de NOSi	Fraca intensidade de NOSi
<b>Tumores não neoplásicos (n = 15)</b>	5 (33,3%)	10 (66,7%)
<b>Neoplasias benignas (n = 21)</b>	6 (28,6%)	15 (71,4%)
<b>Neoplasias malignas (n= 18) *<sup>+</sup></b>	16 (88,9%)	2 (11,1%)

17Teste exato de Fisher; \* $p = 0,0014$  comparado com tumores não neoplásicos; <sup>+</sup> $p = 0,0003$   
18comparado com neoplasias benignas.

19

20

21

22

23

24

25

26

1 A tabela 7 mostra a relação entre a marcação imuno-histoquímica de NOSi e o grau de  
 2diferenciação tumoral. Os casos de câncer de ovário foram divididos em 2 grupos: tumores  
 3bem diferenciados e tumores moderada / pobremente diferenciados. Os tumores de células da  
 4granulosa e os tumores de malignidade *borderline* foram incluídos no grupo de tumores bem  
 5diferenciados. A marcação imuno-histoquímica foi analisada como fraca / moderada  
 6intensidade (marcações 1 / 2) ou forte intensidade (marcação 3) de NOSi. Nenhum caso  
 7maligno teve marcação 0 de NOSi. Expressão de NOSi em forte intensidade em tumores bem  
 8diferenciados foi significativamente mais alta que em tumores moderada / pobremente  
 9diferenciados ( $p = 0,004$ ).

10

11

12**Tabela 7.** Expressão imuno-histoquímica de NOSi e grau de diferenciação tumoral em  
 13pacientes com neoplasia maligna de ovário.

	<b>Forte intensidade de NOSi</b>	<b>Fraca e moderada intensidade de NOSi</b>
<b>Tumores bem diferenciados (n=11)</b>	8 (72,7%)	3 (27,3%)
<b>Tumores moderada e pobremente diferenciados (n=7)</b>	0 (0%)	7 (100%)

14

$p = 0,004$  (Teste exato de Fisher)

15

16

17

18

19

20

21

1 A tabela 8 mostra a relação entre a marcação imuno-histoquímica de NOSi e o  
 2estadiamento tumoral. A comparação foi realizada entre estadiamento I e estadiamentos  
 3III / IV. Não havia nenhuma paciente em estadiamento II. A marcação imuno-histoquímica foi  
 4analisada como fraca / moderada intensidade (marcações 1 / 2) ou forte intensidade (marcação  
 53) de NOSi. Não houve diferença significativa entre a expressão de NOSi e o estadiamento  
 6tumoral.

7

8

9

10**Tabela 8.** Expressão imuno-histoquímica de NOSi e o estadiamento tumoral em pacientes  
 11com neoplasia maligna de ovário.

	<b>Forte intensidade de NOSi</b>	<b>Fraca e moderada intensidade de NOSi</b>
<b>Estadiamento I (n = 6)</b>	4 (66,7%)	2 (33,3%)
<b>Estadiamentos III e IV (n=12)</b>	4 (33,3%)	8 (66,7%)

12

13

14

15

16

17

18Durante o seguimento, cinco (27,8%) de 18 pacientes morreram e dessas, apenas uma  
 19apresentava expressão forte da enzima.

19

20

21

22

23

### 15.3 Concentração de nitrato no líquido intracístico

2

3 Amostras do líquido intracístico foram testadas para metabólitos de NO a fim de  
4estudar a produção do NO no microambiente tumoral. Um tumor não-neoplásico, uma  
5neoplasia benigna e duas neoplasias malignas não foram testadas porque a consistência do  
6fluido cístico era viscosa. A média dos níveis de metabólitos de NO estava significativamente  
7aumentada ( $p = 0,045$ ) em tumores malignos ( $75,7 \mu\text{M}$ ;  $n = 18$ ) comparada com neoplasias  
8benignas ( $38,5 \mu\text{M}$ ;  $n = 27$ ), mas não houve significância entre neoplasias malignas e tumores  
9não neoplásicos ( $40,9 \mu\text{M}$ ;  $n = 14$ ) (figura 5).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

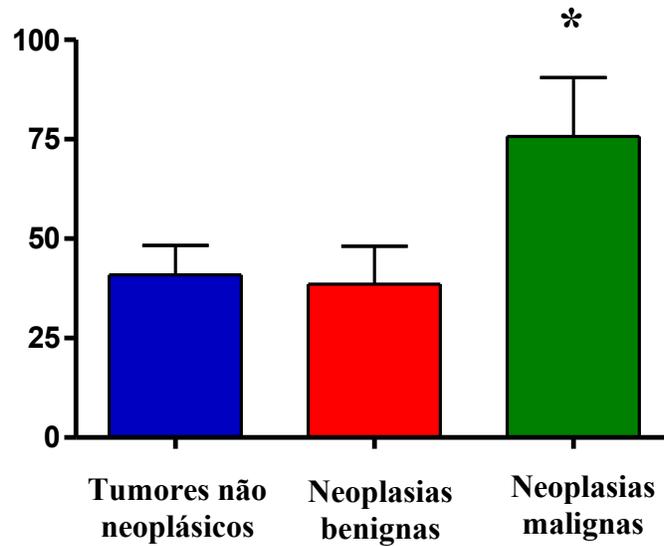
21

22

23

24

1

2 **NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub> μM**

3

4

5

6**Figura 5.** Médias  $\pm$  DP dos níveis de metabólitos de NO em amostras do líquido intracístico  
7obtidos de pacientes com tumores não-neoplásicos (n = 14), neoplasias benignas (n = 27) e  
8neoplasias malignas (n = 18).  $p = 0,045$  (ANOVA),  $*p < 0.05$  comparando com neoplasias  
9ovarianas benignas (Tukey).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 A tabela 9 mostra a relação entre os níveis de NO intracístico e o estadiamento  
 2 tumoral. Os casos de câncer de ovário foram divididos em dois grupos: níveis de NO < 80 µM  
 3 e níveis de NO > 80 µM. O valor de 80 µM foi escolhido por ser próximo à mediana dos  
 4 valores de NO intracístico nas neoplasias malignas (81,6 µM ). A comparação foi realizada  
 5 entre estadiamento I e estadiamentos III / IV. Níveis intracísticos de NO > 80 µM foram  
 6 significativamente mais freqüentes em estadiamento I que em estadiamentos III / IV  
 7 ( $p = 0,0498$ ).

8

9

10

11 **Tabela 9.** Níveis de NO intracístico e estadiamento tumoral em pacientes com câncer de  
 12 ovário.

	Níveis de NO > 80 µM	Níveis de NO < 80 µM
<b>Estadiamento I (n = 7)</b>	6 (85,7%)	1 (14,3%)
<b>Estadiamentos III e IV (n=11)</b>	3 (27,3%)	8 (72,7%)

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

$p = 0,0498$  (Teste exato de Fisher)

1

2 A tabela 10 mostra a relação entre os níveis de NO intracístico e o grau de  
3diferenciação tumoral. Os casos de câncer de ovário foram divididos em 2 grupos: tumores  
4bem diferenciados e tumores moderada / pobremente diferenciados. Os tumores de células da  
5granulosa e os tumores de malignidade *borderline* foram incluídos no grupo de tumores bem  
6diferenciados. Os casos de câncer de ovário foram divididos em dois grupos: níveis de  
7NO < 80 µM e níveis de NO > 80 µM. Não houve significância estatística entre os níveis de  
8NO e o grau de diferenciação tumoral.

9

10

11

12

13**Tabela 10.** Níveis de NO intracístico e o grau de diferenciação tumoral em pacientes com  
14câncer de ovário.

	Níveis de NO > 80 µM	Níveis de NO < 80 µM
<b>Tumores bem diferenciados (n=12)</b>	8 (66,7%)	4 (33,3%)
<b>Tumores moderada e pobremente diferenciados (n=6)</b>	1 (16,7%)	5 (83,3%)

15

$p = 0.1312$  (Teste exato de Fisher)

16

17

18

19

20

21

22

23

#### 15.4 Expressão de NOSi e níveis de metabólitos de NO

2

3 A correlação entre a produção de NO e a expressão da NOSi no tecido tumoral está  
4 mostrada na tabela 11. Não houve correlação significativa entre os níveis de NO intracístico e a  
5 expressão de NOSi no tecido ovariano.

6

7

8

9 **Tabela 11.** Correlação entre a expressão de NOSi tecidual e os níveis de metabólitos de óxido  
10 nítrico em relação ao grupo estudado.

<b>Grupo</b>	<b>Forte intensidade de NOSi</b>
<b>Tumores não neoplásicos (n = 14)</b>	$r = 0.1595; p = 0.5861$
<b>Neoplasias benignas (n = 20)</b>	$r = 0.09415; p = 0.6930$
<b>Neoplasias malignas (n = 16)</b>	$r = 0.1188; p = 0.6612$

11

Teste de correlação de *rank* de Spearman.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1

2

3

## 6. DISCUSSÃO

4

5 As pacientes com neoplasia maligna de ovário tiveram média de idade um pouco  
6 superior em relação às neoplasias benignas e tumores não neoplásicos. Porém, essa média foi  
7 menor que a relatada pela literatura (YANCIK, 1993). Isso pode ser explicado pela inclusão de  
8 tumores de células da granulosa, que ocorrem com maior frequência em idades mais jovens  
9 (BJORKHOLM & PETTERSON, 1980; SCHWEPPE & BELLER, 1982). Isso também pode  
10 explicar o fato de metade dessas pacientes se encontrarem ainda no menacme.

11 Também está de acordo com a literatura o fato de apenas 15% das mulheres com  
12 câncer de ovário serem de raça não branca (McGOWAN, 1989). Além disso, apenas 10%  
13 utilizaram anticoncepção hormonal durante a vida, reforçando a hipótese de que ovulações  
14 repetidas poderiam servir como fator de transformação maligna do epitélio de superfície  
15 ovariana (FATHALLA et al., 1971). Porém, não houve diferença significativa entre a média  
16 de paridade do grupo maligno com os demais grupos. MURTA et al. (1995), avaliando  
17 pacientes com neoplasias malignas, encontraram média superior a quatro gestações por  
18 paciente, em nosso meio.

19 Em relação ao estadiamento, 40% das pacientes foram diagnosticadas em estadiamento  
20 I (não houve estadiamento II), e 60% em estadiamentos III ou IV. Grande parte das neoplasias  
21 malignas de ovário é diagnosticada em estadiamentos III e IV (YANCIK, 1993). Cerca de um  
22 terço dos casos de câncer de ovário são diagnosticadas em estadiamentos I ou II (HACKER et  
23 al., 1983).

1 A produção diferencial de NOSi entre tumores não neoplásicos, neoplasias benignas e  
2neoplasias malignas sugere um papel do NO na carcinogênese ovariana. Nossos resultados  
3mostraram uma alta positividade da enzima NOSi em neoplasias ovarianas malignas  
4comparadas com neoplasias benignas e tumores não neoplásicos. Apenas 2 (11,1%) casos com  
5câncer de ovário não apresentaram positividade para esta enzima. De acordo com esses  
6achados, a literatura mostra que a maioria das neoplasias ovarianas malignas apresenta  
7atividade da NOS, enquanto que ela foi detectada em baixos níveis em pacientes sem câncer  
8(THOMSEN et al., 1994).

9 Contudo, a presença de NOSi também foi detectada em cerca de um terço das  
10neoplasias benignas e tumores não-neoplásicos (33,3% e 28,6%, respectivamente). Isto está de  
11acordo com a literatura, que mostra que a presença da enzima NOSi não está limitada a doença  
12maligna, mas sua expressão também pode estar presente em condições benignas (KLIMP et al  
132001).

14 A expressão da enzima NOS foi demonstrada em tecido maligno de tumores  
15ginecológicos, de mama, sistema nervoso central, gástricos e colorretais, tendo um importante  
16papel na progressão do câncer (THOMSEN et al., 1995; COBBS et al., 1995; JAISWAL et al.,  
172001; CIANCHI et al., 2003; CIANCHI et al., 2004; ICHINOE et al.,2004). O NO é  
18molécula-chave sinalizadora que regula a tumorigênese (JAISWAL et al., 2001). Há  
19evidências de que o NO produzido por células tumorais pode induzir a vasodilatação e  
20aumentar a angiogênese, sendo favorável ao tumor (CHATWAL et al., 1996; BUSSOLINO et  
21al., 1996). Uma associação positiva foi encontrada entre a expressão do NOSi e o aumento da  
22densidade de microvasos tumorais em câncer colorretal humano (CIANCHI et al., 2003).  
23Além disso, a expressão de NOSi em neoplasia maligna endometrial foi associada com o  
24aumento da vascularização e invasão tumoral (LI et al., 2005). Malone et al. (2006)

1 confirmaram o papel potencial da NOSi na angiogênese do tumor ovariano, *in vitro*, e  
2 sugeriram que a inibição da NOSi na angiogênese tumoral ovariana poderia contribuir como  
3 uma nova opção terapêutica para o câncer de ovário. O NO tem também papel, *in vivo*, na  
4 manutenção do fluxo sanguíneo tumoral, desde que a inibição da síntese do NO promove  
5 atividade anti-vascular (NG et al., 2007). Como a vasodilatação persistente é um aspecto  
6 associado à vasculatura tumoral e de tecidos adjacentes, o NO produzido pelo endotélio  
7 vascular no próprio tumor ou próximo a ele poderia regular o fluxo sanguíneo tumoral  
8 (MALONE et al., 2006).

9 Há uma complexa relação entre a expressão de NO, a resposta imune e a progressão do  
10 câncer. Özel et al. (2006) investigaram a expressão de COX-2 e NOSi em carcinomas de  
11 ovário por imuno-histoquímica, e correlacionaram os resultados a outros parâmetros  
12 prognósticos. A expressão de NOSi em carcinomas serosos e de baixo - grau foi  
13 significativamente mais alta que em carcinomas não - serosos e de alto - grau. Tumores em  
14 estadiamentos mais avançados expressaram baixos níveis de NOSi, e a média de tempo de  
15 sobrevivência com baixa expressão de NOS foi mais curta que em tumores com alta expressão  
16 dessa enzima. Mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Isso poderia ser  
17 devido à indução da apoptose com alta expressão de NOSi nos passos iniciais da  
18 carcinogênese, e com a progressão tumoral, ocorreria a diminuição da NOSi e NO, com  
19 inibição da atividade antiproliferativa. Por outro lado, uma correlação positiva da síntese de  
20 NO com a progressão tumoral foi demonstrada em câncer de mama (THOMSEN et al., 1995).

21 Em nosso estudo, pacientes do grupo maligno em estadiamentos iniciais exibiram ní-  
22 veis significativamente mais altos de NO intracístico. Além disso, a expressão da enzima  
23 NOSi em carcinomas bem diferenciados foi significativamente mais alta que em carcinomas

1moderada e pobremente diferenciados. Apenas uma das 5 pacientes que morreram no segui-  
2mento tinha marcação imuno-histoquímica forte, sugerindo que a expressão da enzima NOSi  
3poderia estar relacionada ao prognóstico e à sobrevida. Foi demonstrado que o prognóstico de  
4pacientes com positividade da expressão de NOSi em carcinoma ovariano foi melhor em rela-  
5ção à sobrevida relacionada à doença (ANTILLA et al., 2007). Além disso, altos níveis de ati-  
6vidade de NOSi e produção de NO foram detectados em células não metastáticas, mas não em  
7células metastáticas (XIE 1996).

8       Efeitos da produção de NO na biologia tumoral poderiam se alterar durante a  
9progressão tumoral (AMBS et al., 1998). Geralmente, o maior componente de células  
10mononucleares associadas a tumores (TAM) produz citocinas tipo Th1 e Th2. Um progressivo  
11desvio no comportamento das TAMs de células Th1 a Th2 foi demonstrado durante a  
12evolução tumoral (MANTOVANI et al., 1997), o que potencialmente reduziria a resposta  
13imune ao crescimento tumoral (GOEDEGEBUURE et al., 1997). Macrófagos podem  
14aumentar ou inibir o crescimento tumoral de acordo com o seu estado de ativação  
15(MANTOVANI et al., 1992). Dessa forma, é possível que as citocinas, em neoplasias  
16malignas avançadas, tenham função nos defeitos sistêmicos da imunidade associada às  
17neoplasias (MANTOVANI, 1994). Altas concentrações de NO induzem a apoptose, enquanto  
18que em baixas concentrações, ocorre o crescimento tumoral por indução da angiogênese  
19(HAO et al., 2001).

20       Em contraste com os nossos achados, pacientes com tumores serosos ovarianos avan-  
21çados que apresentaram expressão imuno-histoquímica de NOSi e COX-2 tiveram mais curto  
22intervalo livre de doença e sobrevida, enquanto que pacientes com expressão negativa de

1 NOSi apresentaram completa resposta inicial à quimioterapia de primeira linha (RASPOLLI-  
2 NI et al., 2004).

3 Um aumento estatisticamente significativo nos níveis de metabólitos de NO foi encon-  
4 trado em pacientes com neoplasias ovarianas malignas em comparação com neoplasias benig-  
5 nas. TAVARES-MURTA et al. (2004) estudaram a produção local de NO em pacientes com  
6 cistos anexiais e mostraram que os níveis de metabólitos de NO foram significativamente au-  
7 mentados em neoplasias malignas em relação a tumores ovarianos benignos. Além disso, su-  
8 pernadantes de cultura de células de tumores malignos bem - diferenciados e *borderline* pro-  
9 duziram níveis aumentados de NO comparado com pacientes com tumores pobremente dife-  
10 renciados (THOMSEN et al., 1998).

11 Mas em nosso conhecimento, é o primeiro estudo comparando a produção de NO  
12 intracístico e a expressão de NOSi no tecido tumoral. Nossos resultados sugerem que o NO  
13 intracístico não foi produzido por células tumorais, já que uma correlação significativa entre a  
14 produção de NO e a marcação imuno-histoquímica de NOSi não foi encontrada. Em  
15 concordância, a análise da produção de NO de efusões (fluido ascítico, cístico ou pleural) de  
16 tumores ovarianos malignos mostrou uma correlação significativa entre a porcentagem de  
17 macrófagos e os níveis de NO, sugerindo que essas células são as principais responsáveis pela  
18 síntese de NO no microambiente tumoral (THOMSEN et al., 1998).

19 Além disso, no câncer de ovário foi encontrada associação entre infiltrado de  
20 leucócitos intracísticos aumentados e a produção de NO (TAVARES-MURTA et al., 2004). O  
21 NO produzido por linhagens celulares de carcinoma ovariano está correlacionado com a  
22 intensidade da morte celular tumoral por apoptose (RIEDER et al., 2001). Junto a isso, nossos  
23 resultados sugerem que a enzima NOSi foi expressa por células tumorais. No entanto, a

1enzima NOSi detectada em tumores ovarianos poderia também ser expressa em células imunes  
2(SHERMAN et al., 1993; THOMSEN et al., 1998).

3 O NO é produzido por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células endoteliais  
4e algumas células de carcinoma. Células tumorais e infiltrado de células imunes podem gerar  
5NO *in vitro* (BUSSOLINO et al.,1996). Em nosso estudo, o NOSi detectado em células  
6tumorais foi produzido por elas mesmas, e possivelmente os macrófagos produziram o NO  
7intracístico. O NOSi também tem sido mostrado dentro de células imunes em tecido ovariano  
8em células de linhagem tumoral (SHERMAN et al., 1993).

9 Altas concentrações de NO podem mediar atividade tumoricida, enquanto que baixas  
10concentrações têm sido associadas ao crescimento tumoral. Efeitos aparentemente opostos do  
11NO têm sido atribuídos a fatores, tais quais as diferenças nas isoformas da enzima NOS, níveis  
12de expressão, linhagem celular, ou heterogeneidade dos tecidos neoplásicos (XIE & FIDLER,  
131998). Não somente a produção de NO, mas também a citotoxicidade podem ser totalmente  
14inibidas pela adição de um inibidor específico de NOS, sugerindo que macrófagos ativados  
15podem mediar citotoxicidade NO - dependente. Portanto, a modulação da expressão do gene  
16NOS pode ser manipulada para controlar o crescimento dos tumores e metástases (SHI et al.,  
172000).

18 A produção de NO reflete não somente a natureza maligna ou não do tumor ovariano,  
19mas sua quantidade pode espelhar também o estadiamento e grau de diferenciação tumoral.  
20Novos estudos são necessários para elucidar a questão sobre o papel do óxido nítrico nas  
21neoplasias ovarianas, e o seu comportamento nos diversos estadiamentos tumorais e no  
22microambiente tumoral. O NO é, portanto, um alvo atraente para novas estratégias de  
23diagnóstico, e para futuros métodos de terapia anticâncer.

1 Os resultados mostram que as neoplasias malignas de ovário possuem um maior nível  
2de expressão da enzima NOSi tecidual e níveis mais altos de produção de NO no líquido  
3intracístico tumoral quando comparadas com neoplasias benignas e tumores não neoplásicos,  
4dados confirmados pela literatura. Em relação às neoplasias malignas, em tumores bem  
5diferenciados, é maior a quantidade de NOSi expressa no tecido, e em estadiamentos iniciais,  
6os níveis de metabólitos de óxido nítrico apresentam-se mais altos. Não houve significativa  
7correlação entre a produção do NO tecidual e do NO intracístico, comprovando a hipótese de  
8que a sua produção é realizada em locais distintos, sugerindo que o NO tecidual seja  
9produzido pela própria célula tumoral, e que o NO intracístico seja produzido por macrófagos.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1

2

3

## 7. CONCLUSÕES

4

5

6 1. A expressão de NOSi no tecido de neoplasias malignas de ovário é mais alta em  
7 relação a neoplasias benignas e tumores não neoplásicos.

8

9 2. A produção de metabólitos de óxido nítrico está aumentada em neoplasias malignas de  
10 ovário quando comparada com neoplasias benignas.

11

12 3. A expressão da enzima NOSi está aumentada em tumores bem diferenciados quando  
13 comparada com tumores moderada ou pobremente diferenciados.

14

15 4. Os níveis de NO intracístico estão aumentados em estadiamento I do câncer de ovário  
16 em relação aos estadiamentos III e IV.

17

18 5. Não há uma correlação significativa entre os níveis de NO intracístico e a expressão de  
19 NOSi no tecido tumoral.

20

21

22

23

1

2

3

## 8. RESUMO

4

**5Introdução:** O óxido nítrico (NO) é um mensageiro biológico sintetizado pelo aminoácido L-  
6arginina pela ação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). A NOS neuronal e a endotelial  
7são constitutivas em muitos tipos celulares, enquanto a NOSi é induzida em leucócitos, células  
8endoteliais e outros tipos celulares após a estimulação por endotoxina de bactérias ou  
9citocinas, com NO produzido em altas concentrações. O NO pode apresentar um duplo papel  
10no desenvolvimento tumoral. Evidências sugerem que ele é citotóxico e citostático contra  
11microrganismos e células malignas. Mas a produção de NO por células neoplásicas promove a  
12angiogênese, essencial ao crescimento e manutenção do tumor, podendo aumentar seu  
13comportamento metastático. NO é uma molécula sinalizadora biológica, mas quando  
14produzida por longo período de tempo, o excesso de NO poderia levar a mutações e ao câncer.

15

**16Objetivos:** Quantificar os níveis de metabólitos de NO em tumores ovarianos e avaliar se  
17existem diferenças de seus níveis entre tumores não neoplásicos, neoplasias benignas e  
18neoplasias malignas primárias de ovário; verificar a expressão da enzima NOSi no tecido de  
19tumores não neoplásicos, neoplasias benignas e malignas primárias de ovário; investigar a  
20relação entre a expressão da enzima NOSi e o estadiamento e grau de diferenciação tumoral  
21nas neoplasias malignas de ovário; investigar a relação entre os metabólitos de NO e o  
22estadiamento e grau de diferenciação tumoral nas neoplasias malignas de ovário; correlacionar  
23a produção de NO intracístico com a expressão da enzima NOSi tecidual.

1

2**Material e Métodos:** O estudo envolveu 63 mulheres submetidas a cirurgia para tumor  
3anexial, divididas em 3 grupos: tumores não-neoplásicos (n=15), neoplasias benignas (n=28),  
4e neoplasias malignas (n=20). O fluido cístico foi coletado por punção após a ressecção  
5cirúrgica para a determinação da concentração de nitrato (método de *Griess*). Estudo imuno-  
6histoquímico para NOSi foi realizado no tecido tumoral.

7

8**Resultados:** Marcação da NOSi foi significativamente aumentada em câncer de ovário  
9comparado com tumores não-neoplásicos ( $p=0,0014$ ) e neoplasias benignas ( $p=0,0003$ ). Os  
10níveis de metabólitos de NO estavam significativamente aumentados em tumores malignos  
11comparados com neoplasias benignas ( $p=0,045$ ). Em câncer de ovário, o número de casos com  
12NO intracístico  $> 80 \mu\text{M}$  em estadiamento I foi significativamente mais alto quando  
13comparado com NO intracístico  $< 80 \mu\text{M}$  ( $p=0,0498$ ). A expressão da NOSi em tumores bem  
14diferenciados foi significativamente mais alta que em tumores moderada e pobremente  
15diferenciados ( $p=0,004$ ). Não houve correlação significativa entre o NO intracístico e a  
16intensidade de marcação imuno-histoquímica.

17

18**Conclusões:** A expressão de NOSi no tecido de neoplasias malignas de ovário é mais alta em  
19relação a neoplasias benignas e tumores não-neoplásicos; a produção de metabólitos de óxido  
20nitríco está aumentada em neoplasias malignas de ovário; a expressão da enzima NOSi está  
21aumentada em tumores bem diferenciados comparado com tumores moderada ou pobremente  
22diferenciados; níveis de NO intracístico estão aumentados em estadiamento I do câncer de  
23ovário comparado com estadiamentos III e IV; não há uma correlação significativa entre os  
24níveis de NO intracístico e a expressão de NOSi no tecido tumoral.

1

2

3

4

5

## 9. ABSTRACT

6

**7Introduction:** Nitric oxide (NO) is a biological messenger synthesized from the L-arginine  
8amino acid by the action of the nitric oxide synthase (NOS) enzyme. The endothelial and  
9neuronal NOS are constitutive in many cell types, while the inducible NOS (iNOS) is induced  
10in leucocytes, endothelial cells and other cell types after stimulation by bacterial endotoxin or  
11cytokines, with NO produced at higher concentrations. NO can present a dual role in tumor  
12development. Evidences suggest that it is cytotoxic and cytostatic against microorganisms and  
13malignant cells. The NO production by neoplastic cells promotes angiogenesis, essential to the  
14growing and maintenance of the tumor, besides it can increase the metastatic behavior of the  
15tumor. NO is a biological signaling molecule, but when produced for a long period of time, the  
16excess of NO could lead to mutations and to cancer.

17

**18Objectives:** The objectives of this study were to quantify the levels of NO metabolites and the  
19expression of iNOS enzyme in ovarian tumors; to evaluate the relationship of NOS expression  
20and the levels of NO metabolites with the ovarian cancer staging and the grade of tumoral  
21differentiation; to compare intracystic nitrate levels with immunohistochemical staining of the  
22iNOS enzyme.

23

1

2

**3Material and Methods:** The study enrolled 63 women underwent surgery for an adnexal  
4mass, divided in three groups: non-neoplastic tumors (n=15), benign neoplasias (n=28), and  
5malignant neoplasias (n=20). The cystic fluid samples were collected by puncture after  
6surgical resection for determination of nitrate concentration (Griess method).  
7Immunohistochemical study was performed in the tumoral tissue.

8

**9Results:** iNOS immunostaining was significantly increased in ovarian cancer compared with  
10non-neoplastic tumors ( $p=0.0014$ ) and benign neoplasias ( $p=0.0003$ ). The NO metabolite  
11levels were significantly increased in malignant tumors compared to benign neoplasias  
12( $p=0.045$ ). In ovarian cancer, the number of cases with NO intracystic levels  $> 80 \mu\text{M}$  in stage  
13I was significantly higher compared with NO intracystic levels  $< 80\mu\text{M}$  ( $p=0.0498$ ). The  
14expression of iNOS in well - differentiated carcinomas was significantly higher than in  
15moderately / poorly differentiated tumors ( $p=0.004$ ). There was not correlation between  
16intracystic NO levels and intensity of immunohistochemical staining.

17

**18Conclusion:** Expression of iNOS enzyme in the tissue of malignant neoplasias of the ovary is  
19higher related to the benign neoplasias and non-neoplastic tumors; production of NO  
20metabolites is increased in ovarian malignant neoplasias; expression of iNOS is increased in  
21well - differentiated tumors compared to moderately / poorly differentiated tumors; NO  
22intracystic levels is increased in stage I of ovarian cancer compared to stages III / IV; and  
23there is not a correlation between intracystic NO levels and NO produced in the tissue.

1

2

3

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

41. AKAIKE, T.; MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, Oxford, v. 101,  
5 n. 3, p. 300-8, Mar./Apr. 2000.
62. AMBS, S.; MERRIAM, W. G.; BENNETT, W. P.; FELLE-Y-BOSCO, E.;  
7 OGUNFUSIKA, M. O.; OSER, S. M.; KLEIN, S.; SHIELDS, P. G.; BILLIAR, T. R.;  
8 HARRIS, C. C. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas:  
9 implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. **Cancer Res.**, Chicago,  
10 v. 58, n. 2, p. 334-41, Jan. 1998.
113. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Overview:** ovarian cancer 2006. New York:  
12 American Cancer Society Inc., 2006. Disponível em:  
13 <<http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/>. Acesso em: 25 out. 2007.
144. ANDRADE, S. P.; HART, I. R.; PIPER, P. J. Inhibitors of nitric oxide synthase  
15 selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. **Br. J. Pharmacol.**, London,  
16 v. 107, n. 4, p. 1092-5, Dec. 1992.
175. ANTTILA, M. A.; VOUTILAINEN, K.; MERIVALO, S.; SAARIKOSKI, S.; KOSMA,  
18 V. M. Prognostic significance of iNOS in epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, New  
19 York, v. 105, n. 1, p. 97-103, Apr. 2007.
206. ARANGO, H. G. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara  
21 Koogan, 2001. p. 93-113.
227. AUERSPERG, N.; WONG, A. S.; CHOI, K. C.; KANG, S. K.; LEUNG, P. C. Ovarian  
23 surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.  
24 22, n. 2, p. 255-88, Apr. 2001.
258. BECHTEL, M. K.; BONAVIDA, B. Inhibitory effects of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone  
26 on ovarian carcinoma cell proliferation: a potential role for inducible nitric oxide synthase.  
27 **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 82, n. 1, p. 127-38, July 2001.

19. BJORKHOLM, E.; PETTERSON, F. Granulosa-cell and theca-cell tumors: the clinical  
2 picture and long-term outcome for the radiumhemmet series. **Acta Obstet. Gynecol.**  
3 **Scand.**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 361-5, 1980.
410. BRAUNSCHWEIGER, P. G.; CAMERON, D.; SHARPE, L.; ALI-OSMAN, F.; GRIMM,  
5 E.; BUZAID, A. CisPlatin and nitric oxide have synergistic antitumor activity in cP  
6 resistant human melanoma cells. **Proc. AACR.**, local, v. 37, p. 1865, 1996.
711. BRENNAN, P. A.; DOWNIE, I. P.; LANGDON, J. D.; ZAKI, G. A. Emerging role of  
8 nitric oxide in cancer. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 37, n. 5, p. 370-3, Oct.  
9 1999.
1012. BUSSOLINO F.; ALBINI A.; CAMUSSI, G.; PRESTA, M.; VIGLIETTO, G.; ZICHE,  
11 M.; PERSICO, G. Role of soluble mediators in angiogenesis. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v.  
12 32A, n. 14, p. 2041-12, Dec.1996.
1313. CANTUARIA, G.; MAGALHAES, A.; ANGIOLI, R.; MENDEZ, L.; MIRHASHEMI, R.;  
14 WANG, J.; WANG, P.; PENALVER, M.; AVERETTE, H.; BRAUNSCHWEIGER, P.  
15 Antitumor activity of a novel glyco-nitric oxide conjugate in ovarian carcinoma. **Cancer**,  
16 New York, v. 88, n. 2, p. 381-8, Jan. 2000.
1714. CASAGRANDE, J. T.; LOUIE, E. W.; PIKE, M. C.; ROY, S.; ROSS, R. K.;  
18 HENDERSON, B. E. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. **Lancet**, London, v. 2, n.  
19 8135, p. 170-3, July 1979.
2015. CHERCHI, P. L.; CAPOBIANCO, G.; AMBROSINI, G.; FADDA, G. M.; PIGA, M. D.;  
21 RUIU, G.; FATTORINI, F.; DESSOLE, S. Intracystic evaluation of tumor markers in  
22 benign and malignant ovarian pathology. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, Padua, v. 23, n. 2, p.  
23 163-5, 2002.
2416. CHHATWAL, V. J.; MOOCHHALA, S. M.; CHAN S. T.; NGOI, S. S. Nitric oxid and  
25 cancer. **Med. Hypotheses**, Edinburgh, v. 46, n. 1, p. 21-4, Jan. 1996.
2617. CHRISTIAN, J.; THOMAS, H. Ovarian cancer chemotherapy. **Cancer Treat. Rev.**,  
27 London, v. 27, n. 2, p. 99-109, Apr. 2001.
2818. CHU, C. S.; WOO, E. Y.; TOLL, A. J.; RUBIN, S. C.; JUNE, C. H.; CARROLL, R. G.;  
29 SCHLIENGER, K. Tumor-associated macrophages as a source of functional dendritic  
30 cells in ovarian cancer patients. **Clin. Immunol**, Orlando, v. 102, n. 3, p. 291-301, Mar.  
31 2002.

119. CHU, S. C.; MARKS-KONCZALIK, J.; WU, H. P.; BANKS, T. C.; MOSS, J. Analysis of  
2 c, the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene:  
3 characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. **Biochem.**  
4 **Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 248, n. 3, p. 871-8, July 1998.
520. CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIE, O.; MESSERINI, L.; SARDI, I.;  
6 LASAGNA, N.; PERNA, F.; FABBRONI, V.; DI FELICE, A.; PERIGLI, G.;  
7 MAZZANTI, R.; MASINI, E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic  
8 effect of nitric oxide in colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.**, Chicago, v. 10, n. 8, p. 2694-  
9 704, Apr. 2004.
1021. CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIE, O.; MESSERINI, L.; SCHIAVONE, N.;  
11 VANNACCI, A.; NISTRI, S.; SARDI, I.; BARONI, G.; MARZOCCA, C.; PERNA, F.;  
12 MAZZANTI, R.; BECHI, P.; MASINI, E. Inducible nitric oxide synthase expression in  
13 human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. **Am. J. Pathol.**,  
14 Philadelphia, v. 162, n. 3, p. 793-801, Mar. 2003.
1522. COBBS, C. S.; BRENMAN, J. E.; ALDAPE, K. D.; BREDT, B. S.; ISRAEL, M. A.  
16 Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. **Cancer Res.**,  
17 Chicago, v. 55, n. 4, p. 527-30, Feb. 1995.
1823. CORMIO, G.; ROSSI, C.; CAZZOLLA, A.; RESTA, L.; LOVERRO, G.; GRECO, P.;  
19 SELVAGGI, L. Distant metastasis in ovarian carcinoma. **Int. J. Gynecol. Cancer**,  
20 Cambridge, v. 13, n. 2, p. 125-9, Mar./Apr. 2003.
2124. DASKALAKIS, G.; KALMANTIS, K.; SKARTADOS, N.; THOMAKOS, N.;  
22 HATZIOANNOU, L.; ANTSAKLIS, A. Assessment of ovarian tumors using transvaginal  
23 color Doppler ultrasonography. **Eur. J. Gynaec. Oncol.**, Padua, v. 25, n. 5, p. 594-5,  
24 2004.
2525. DEUTSCH, M.; BECK, D.; MANOR, D.; BRANDES, J. Metastatic brain tumor following  
26 negative second-look operation for ovarian carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 27,  
27 n. 1, p. 116-20, May 1987.
2826. DORUM, A.; KRISTENSEN, G. B.; ABELER, V. M.; TROPÉ, C. G.; MOLLER, P. Early  
29 detection of familial ovarian cancer. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 32A, n. 10, p. 1645-51,  
30 Sep. 1996.
3127. EDWARDS, P.; CENDAN, J. C.; TOPPING, D. B.; MOLDAWER, L. L.; MACKAY, S.;  
32 COPELAND, E. M. III; LIND, D. S. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth *in vitro*,

- 1 but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis *in vivo*. **J. Surg. Res.**,  
2 Philadelphia, v. 63, n. 1, p. 49-52, Jun. 1996.
328. FATHALLA, M. F. Incessant ovulation: factor in ovarian neoplasia? **Lancet**, London, v.  
4 2, n. 7716, p.163, July 1971.
529. FELDMAN, G. B.; KNAPP, R. C. Lymphatic drainage of the peritoneal cavity and its  
6 significance in ovarian cancer. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 119, n. 7, p. 991-4,  
7 Aug. 1974.
830. FISHMAN, D.; COHEN, L.; BLANK, S. V.; SHULMAN, L.; SINGH, D.; BOZORGI, K.;  
9 TAMURA, R.; TIMOR-TRITSCH, I.; SCHWARTZ, P. E. The role of ultrasound  
10 evaluation in the detection of early-stage epithelial ovarian cancer. **Am. J. Obstet.**  
11 **Gynecol.**, St. Louis, v. 192, n. 4, p. 1214-22, Apr. 2005.
1231. GALLION, H. H.; VAN NAGELL J. R.; DONALDSON, E. S.; HIGGINS, R. V.;  
13 POWELL, D. E.; KRYSCIO, R. J. Adjuvant oral alkylant chemotherapy in patients with  
14 stage I epithelial ovarian cancer. **Cancer**, New York, v. 63, n. 6, p. 1070-3, Mar. 1989.
1532. GARBÁN, H. J.; BONAVIDA, B. Nitric oxide inhibitor the transcription repressor Yin-  
16 Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric  
17 oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. **J. Immunol.**,  
18 Baltimore, v. 167, n. 1, p. 75-81, July 2001.
- 19<sup>33</sup>. GOEDEGEBUURE, P. S.; DOUVILLE, C. C.; DOHERTY, J. M.; LINEHAN, D. C.;  
20 LEE, K. Y.; GANGULY, E. K.; EBERLEIN, T. J. Simultaneous production of T-helper-1-  
21 like cytokines and cytolytic activity by tumor-specific T cells in ovarian and breast cancer.  
22 **Cell Immunol.**, New York, n. 175, n. 2 , p. 150-6, Feb. 1997.
2334. GREEN, L. C.; RUIZ DE LUZURIAGA, K.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.;  
24 YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad.**  
25 **Sci. U.S.A.**, Washington, v. 78, n. 12, p. 7764-8, Dec. 1981.
2635. GUERRIERO, S.; AJOSSA, S.; GARAU, N.; PIRAS, B.; PAOLETTI, A. M.; MELIS, G.  
27 B. Ultrasonography and color Doppler-based triage for adnexal masses to provide the most  
28 appropriate surgical approach. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 192, n. 2, p. 401-6,  
29 Feb. 2005.
3036. GUERRIERO, S.; AJOSSA, S.; LAI, M. P.; ALCAZAR, J. L.; PAOLETTI, A. M.;  
31 MARISA, O.; MELIS, G. B. The diagnosis of funcional ovarian cysts using transvaginal

- 1 ultrasound combined with clinical parameters, CA125 determinations, and color Doppler.  
2 **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 83-8, Sept. 2003.
337. HACKER, N. F.; BEREK, J. S.; LAGASSE, L. D.; NIEBERG, R. K.; ELASHOFF, R. M.  
4 Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. **Obstet. Gynecol.**, New York,  
5 v. 61, n. 4, p. 413-20, Apr. 1983.
638. HAO, X. P.; PRETLOW, T. G.; RAO, J. S.; PRETLOW, T. P. Inducible nitric oxide  
7 synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors  
8 from the same patients. **Cancer Res.**, Chicago, v. 61, n. 2, p. 419-22, Jan. 2001.
939. ICHINOE, M.; MIKAMI, T.; SHIRAISHI, H.; OKAYASU, I. High microvascular density  
10 is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early  
11 gastric carcinomas. **Histopathology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 612-8, Dec. 2004.
1240. INCA – Câncer de Ovário. Disponível em:  
13 <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=341](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=341)>. Acesso em: 25 out. 2007.
1441. INTERNATIONAL FEDERATION OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS (FIGO).  
15 Classification and staging of malignant tumors in the female pelvis. **Acta Obstet.**  
16 **Gynecol. Scand.**, Copenhagen, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1971.
1742. JAISWAL, M.; LARUSSO, N. F.; GORES, G. J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial  
18 cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. **Am. J. Physiol. Gastrointest.**  
19 **Liver Physiol.**, Bethesda, v. 281, n. 3, p. G626-34, Sept. 2001.
2043. KLIMP, A. H.; HOLLEMA, H.; KEMPINGA, C.; VAN DER ZEE, A. G. J.; VRIES, E. G.  
21 E.; DAEMEN, T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in  
22 human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. **Cancer Res.**, Chicago, v. 61, n.  
23 19, p. 7305-09, Oct. 2001.
2444. LA VECCHIA, C. Epidemiology of ovarian cancer: a summary review. **Eur. J. Cancer**  
25 **Prev.**, Oxford, v. 10, n. 2, p.125-9, Apr. 2001.
2645. LEROUX, P. D.; BERGER, M. S.; ELLIOTT, J. P.; TAMIMI, H. K. Cerebral metastases  
27 from ovarian carcinoma. **Cancer**, New York, v. 67, n. 8, p. 2194-9, Apr. 1991.

146. LI, L. M.; KILBOURN, R. G.; ADAMS, J.; FIDLER, I. J. Role of nitric oxide in lysis of  
2 tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. **Cancer Res.**, Chicago, v. 51, n. 10, p.  
3 2531-5, May 1991.
447. LI, W.; XU, R. J.; JIANG, L. H.; SHI, J.; LONG, X.; FAN, B. Expression of  
5 cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in  
6 endometrial carcinoma. **Med. Oncol.**, Northwood, v. 22, n. 1, p. 63-70, 2005.
748. MALONE, J. M.; SAED, G. M.,.; DIAMOND, M. P.; SOKOL, R. J.; MUNKARAH, A. R.  
8 The effects of the inhibition of inducible nitric oxide synthase on angiogenesis of epithelial  
9 ovarian cancer. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 194, n. 4, p. 1110-8, Apr. 2006.
1049. MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm  
11 for the *in vivo* function of chemokines. **Laboratory Invest.**, New York, v. 71, n. 1, p. 5-  
12 16, Jul. 1994.
1350. MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. The origin  
14 and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, Amsterdam, v. 13, n. 7,  
15 p. 265-70, Jul. 1992.
1651. MANTOVANI, A.; MACCIÒ, A.; PISANO, M.; VERSACE, R.; LAI, P.; ESU, S.;  
17 MASSA, E.; GHIANI, M.; DESSÌ, D.; MELIS, G. B.; DEL GIACCO, G. S. Tumor-  
18 associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in  
19 comparison with patient autologous PBMCs but are capable of releasing high amounts of  
20 various cytokines. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 71, n. 5, p. 724-31, May 1997.
2152. MCGOWAN, L. Epidemiology of ovarian cancer. **Oncology** (Williston Park), New York,  
22 v. 3, n. 1, p. 51-4, 1989.
2353. MILES, A. M.; OWENS, M. W.; MILLIGAN, S.; JOHNSON, G. G.; FIELDS, J. Z.; ING  
24 T. S.; KOTTAPALLI, V.; KESHAVARZIAN, A.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide  
25 synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. **J. Leukoc. Biol.**,  
26 New York, v. 58, n. 5, p. 616-22, Nov. 1995.
2754. MINARETZIS, D.; TSIONOU, C.; TZIORTZIOTIS, D.; MICHALAS, S.;  
28 ARAVANTINOS, D. Ovarian tumors: prediction of the probability of malignancy by  
29 using patient's age and tumor morphologic features with a logistic model. **Gynecol.**  
30 **Obstet. Invest.**, Basel, v. 38, n. 2, p. 140-4, 1994.

155. MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: physiology,  
2 pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-42,  
3 June 1991.
456. MURDOCH, W. J.; MCDONNELL, A. C. Roles of the ovarian surface epithelium in  
5 ovulation and carcinogenesis. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 6, p. 743-50, June  
6 2002.
757. MURTA, E. F. C.; ANDRADE, J. M.; BIGHETTI, S. Aspectos epidemiológicos do câncer  
8 de ovário. **J. Bras. Ginecol**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 269-74, 1995.
958. MURTA, E. F. C.; NOMELINI, R. S. Early diagnosis and predictors of malignancy in the  
10 evaluation of adnexal mass. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p.  
11 14-9, Feb. 2006.
1259. MURTA, E. F. C.; SILVA, C. S.; GOMES, R. A. S.; TAVARES-MURTA, B. M.; MELO,  
13 A. L. Ultrasonographic criteria and tumor marker assay are good procedures for the  
14 diagnosis of ovarian neoplasia in preselected outpatients. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**,  
15 Padua, v. 25, n. 6, p. 707-12, 2004.
1660. NG, Q. S.; GOH, V.; MILNER, J.; STRATFORD, M. R.; FOLKES, L. K.; TOZER, G.  
17 M.; SAUNDERS, M. I.; HOSKIN, P. J. Effect of nitric-oxide synthesis on tumour blood  
18 volume and vascular activity: a phase I study. **Lancet Oncol.**, London, v. 8, n. 2, p. 111-8,  
19 Feb. 2007.
2061. OHSIMA H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer  
21 risk factors possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 305,  
22 n. 2, p. 253-64, Mar. 1994.
2362. ORTH, K.; HUNG, J.; GAZDAR, A.; BOWCOCK, A.; MATHIS, J. M.; SAMBROOK, J.  
24 Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**,  
25 Washington, v. 91, n. 20, p. 9495-9, Sept. 1994.
2663. OSMERS, R. G. W.; OSMERS, M.; VON MAYDELL, B.; WAGNER, B.; KUHN, W.  
27 Evaluation of ovarian tumors in the post-menopause by transvaginosonography. **Eur. J.**  
28 **Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 81-8, Mar. 1998.
2964. ÖZEL, E.; PESTERELI, H. E.; SIMSEK, T.; ENDORGAN, G.; KARAVELI, F. S.  
30 Expression of ciclooxigenase-2 and inducible nitric oxide synthase in ovarian surface

- 1 epithelial carcinoma: is there any correlation with angiogenesis or clinicopathologic  
2 parameters? **Int. J. Gynecol. Cancer**, Cambridge, v. 16, n. 2, p. 549-55, Mar./Apr. 2006.
365. PADILLA, L. A.; RADOSEVICH, D. M.; MILAD, M. P. Limitations on the pelvic  
4 examination for evaluation of the female pelvic organs. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, New  
5 York, v. 88, n. 1, p. 84-8, Jan. 2005.
666. PERKINS, G. L.; SLATER, E. D.; SANDERS, G. K.; PRICHARD, J. G. Serum tumor  
7 markers. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v. 68, n. 6, p. 1075-82, Sept. 2003.
867. PETTERSSON, F.; COPPLESON, M.; CREASMAN, W.; LUDWIG, H.; SHEPHERD, J.  
9 **Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer**. Stockholm:  
10 International Federation of Gynecology and Obstetrics, 1988. p. 110-151.
1168. PIVER, M. S.; BARLOW, J. J.; LELE, S. B. Incidence of subclinical matastasis in stage I  
12 and II ovarian carcinoma. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 52, n. 1, p. 100-4, July 1978.
1369. POHL, J.; BERTRAM, B.; HILGARD, P.; NOWROUSIAN, M. R.; STUBEN, J.;  
14 WIESSLER, M. D-19575-a sugar-linked isophosphoramidate mustard derivative exploiting  
15 transmembrane glucose transport. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Berlin, v. 35, n. 5, p.  
16 364-70, 1995.
1770. RAO, C. V.; INDRANIE, C.; SIMI, B.; MANNING, P. T.; CONNOR, J. R.; REDDY, B.  
18 S. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in  
19 colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective  
20 cyclooxygenase-2 inhibitor. **Cancer Res.**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 165-70, Jan. 2002.
2171. RAPKIEWICZ, A. V.; ESPINA, V.; PETRICOIN, E. F. 3rd.; LIOTTA, L. A. Biomarkers  
22 of ovarian tumours. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 40, n. 17, p. 2604-12, Nov. 2004.
2372. RASPOLLINI, M. R.; AMUNNI, G.; VILLANUCCI, A.; BODDI, V.; BARONI, G.;  
24 TADDEI, A.; TADDEI, G. L. Expression of inducible nitric oxide synthase and  
25 cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. **Gynecol. Oncol.**  
26 New York, v. 92, n. 3, p. 806-12, Mar. 2004.
2773. REIS, F. M.; FALETTI, A.; BIFULCO, G.; CAUCI, S.; QUADRIFOGLIO, F.; DOR, J.;  
28 PETRAGLIA, F. High concentrations of inhibin A and inhibin B in ovarian serous  
29 cystadenoma: relationship with oestradiol and nitric oxide metabolites. **Mol. Hum.**  
30 **Reprod.**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1079-83, Dec. 2000.

174. RIEDER, J.; JAHNKE, R.; SCHLOESSER, M.; SEIBEL, M.; CZECHOWSKI, M.;  
2 MARTH, C.; HOFFMANN, G. Nitric oxide-dependent apoptosis in ovarian carcinoma  
3 cell lines. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 82, n. 1, p. 172-6, July 2001.
475. RIEDER, J.; MARTH, C.; TOTZKE, G.; SMOLNY, M.; SEIBEL, M.; HOFFMANN, G.  
5 Different patterns of inducible nitric oxide synthase gene expression in ovarian carcinoma  
6 cells lines. **Anticancer Res.**, Athens, v. 20, n. 5A, p. 3251-58, Sept./Oct. 2000.
776. RUBIN, S. C. Surgery for ovarian cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**,  
8 Philadelphia, v. 6, n. 4, p. 851-65, Aug. 1992.
977. SCHMIDT, H. H. H. W.; WILKE, P.; EVERS, B.; BOHME, E. Enzymatic formation of  
10 nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. **Biochem. Biophys. Res.**  
11 **Commun.**, New York, v. 165, n. 1, p. 284-91, Nov. 1989.
1278. SCHWEPPE, K. W.; BELLER, F. K. Clinical data of granulosa cell tumors. **J. Cancer**  
13 **Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 104, n. 1-2, p. 161-9, 1982.
1479. SEROV, S. F.; SCULLY, R. E.; SOBIN, L. H. **International histological classification**  
15 **of tumours, n° 9**: histological typing of ovarian tumours. Geneva: World Health  
16 Organization, 1973.
1780. SHERMAN, P. A.; LAUBACH, V. E.; REEP, B. R.; WOOD, E. R. Purification and  
18 cDNA sequence of inducible nitric oxide synthase from a tumour cell line. **Biochemistry**,  
19 Washington, v. 32, n. 43, p. 11600-5, Nov. 1993.
2081. SHI, Q.; XIONG, Q.; WANG, B.; XIAGDONG, L.; KHAN, N. A.; XIE, K. Influence of  
21 nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis. **Cancer Res.**,  
22 Chicago, v. 60, n. 10, p. 2579-83, May 2000.
2382. SILVERBERG, E.; BORING, C.; SQUIRES, T. Cancer statistics, 1990. **CA Cancer J**  
24 **Clin.**, New York, v. 40, n. 1, p. 9-26, Jan./Feb. 1990.
2583. SZPUREK, D.; MOSZYNIKI, R.; SAJDAK, S. Clinical value of the ultrasound Doppler  
26 index in determination of ovarian tumor malignancy. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, Padua, v.  
27 25, n. 4, p. 442-4, 2004.

184. SZPUREK, D.; MOSZYNIKI, R.; ZIETKOWIAK, W.; SPACZYNSKI, M.; SAJDAK, S.  
2 An ultrasonographic morphological index for prediction of ovarian tumor malignancy.  
3 **Eur. Gynaecol. Oncol.**, Padua, v. 26, n. 1, p. 51-4, 2005.
485. TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. D. E. Q.; MIRANDA, R.; ADAD, S. J.;  
5 MURTA, E. F. C. Differential tumor microenvironment in human ovarian cystic tumors.  
6 **Tumori**, Milano, v. 90, n. 5, p. 491-7, Sept./Oct. 2004.
786. TAVARES-MURTA, B. M.; NOMELINI, R. S.; MURTA, E. F. C. Tumor markers in  
8 ovarian neoplasia. In: COLUMBUS, F. (Org.). **New research communications on tumor**  
9 **markers**. New York: Nova Science Publishers, 2007.
1087. THOMSEN, L. L.; LAWTON, F. G.; KNOWLES, R. G.; BEESLEY, J. E.; RIVEROS-  
11 MORENO, V.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological  
12 cancer. **Cancer Res.**, Chicago, v. 54, n. 5, p. 1352-4, Mar. 1994.
1388. THOMSEN, L. L.; MILES, D. W.; HAPPERFIELD, L.; BOBROW, L. G.; KNOWLES,  
14 R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **Br. J.**  
15 **Cancer**, London, v. 72, n. 1, p. 41-4, July 1995.
1689. THOMSEN, L. L.; SARGENT, J. M.; WILLIAMSON, C. J.; ELGIE, A. W. Nitric oxide  
17 synthase activity in fresh cells from ovarian tumor tissue: relationship of enzyme activity  
18 with clinical parameters of patients with ovarian cancer. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.  
19 56, n. 10, p. 1365-70, Nov. 1998.
2090. U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for ovarian cancer:  
21 recommendation statement. **Ann. Fam. Med.**, Leawood, v. 2, n. 3, p. 260-2, May/June  
22 2004.
2391. WONG, A. S. T.; AUERSPERG, N. Ovarium surface epithelium: family history and early  
24 events in ovarian cancer. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, London, v. 1, p. 70, Oct. 2003.
2592. WOOLAS, R. P.; CONAWAY, M. R.; XU, F.; JACOBS, I. J.; YU, Y.; DALY, L.;  
26 DAVIES, A. P.; O'BRIANT, K.; BERCHUCK, A.; SOPER, J. T. et al. Combinations of  
27 multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant  
28 from benign pelvic masses. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 59, n. 1, p. 111-6, Oct. 1995.
2993. XIE K.; FIDLER, I. J. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric  
30 oxide synthase. **Cancer Metastasis Rev.**, Boston, v. 17, n. 1, p. 55-75, Mar. 1998.

194. XIE, K.; DONG, Z.; FIDLER, I. J. Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition  
2 of cancer metastasis. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 59, n. 6, p. 797-803, June 1996.
395. XU, W.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric  
4 oxide in cancer. **Cell Res.**, Beijing, v. 12, n. 5/6, p. 311-20, Dec. 2002.
596. YANCIK, R. Ovarian cancer: age contrast in incidence, histology, disease stage at  
6 diagnosis, and mortality. **Cancer**, New York, v. 71, suppl. 2, p. 517-23, Jan. 1993.
797. YANCIK, R.; RIES, L. G.; YATES, J. Ovarian cancer in the elderly: an analysis of  
8 surveillance, epidemiology, and results program data. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.  
9 154, n. 3, p. 639-47, Mar. 1986.
1098. YAWN, B. P.; WOLLAN, P.; KLEE, M.; BARRETTE, B. Ovarian carcinoma: care and  
11 survival in a community-based population. **Clin. Ther.**, Princeton, v. 23, n. 1, p. 146-59,  
12 Jan. 2001.
1399. YIM, C-Y.; BASTIAN, N. R.; SMITH, J. C.; HIBBS Jr., J. B.; SAMLOWSKI, W. E.  
14 Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine  
15 skin cancers. **Cancer Res.**, Chicago, v. 53, n. 22, p. 5507-11, Nov. 1993.
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23

1

**ANEXO A**2 **PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE**3 **ÉTICA EM PESQUISA DA UFTM**

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

1

**ANEXO B**

2

3

**CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES OVARIANOS**

4

**SEGUNDO A OMS**

5

**6 Tumores epiteliais comuns**

7

8 • Tumores serosos

9 1. Benignos

10 ▪ Cistoadenoma e cistoadenoma papilífero

11 ▪ Papiloma superficial

12 ▪ Adenofibroma e cistoadenoma fibroma

13 2. *Borderline*

14 • Cistoadenoma e cistoadenoma papilífero

15 • Papiloma superficial

16 • Adenofibroma e cistoadenofibroma

17 3. Malignos

18 a) Adenocarcinoma, adenocarcinoma papilífero e cistoadenocarcinoma papilífero

19 b) Carcinoma papilífero superficial

20 c) Adenofibroma maligno e cistoadenofibroma

21

22

23 • Tumores mucinosos

- 1 1. Benignos
- 2 • Adenoma e cistoadenoma
- 3 • Adenofibroma e cistoadenofibroma
- 4 2. *Borderline*
- 5 • Adenoma e cistoadenoma
- 6 • Adenofibroma e cistoadenofibroma
- 7 3. Malignos
- 8 • Adenocarcinoma e cistoadenocarcinoma
- 9 • Adenofibroma maligno e cistoadenofibroma
- 10 • Tumores endometrióides
- 11 4. Benignos
- 12 • Adenoma e cistoadenoma
- 13 • Adenofibroma e cistoadenofibroma
- 14 5. *Borderline*
- 15 • Adenoma e cistoadenoma
- 16 • Adenofibroma e cistoadenofibroma
- 17 6. Malignos
- 18 a) Carcinoma
- 19 ■ Adenocarcinoma
- 20 ■ Adenoacantoma
- 21 ■ Adenofibroma maligno
- 22 b) Sarcomas do estroma endometrióide
- 23 c) Tumores mesodérmicos mistos

- 1 • Tumores das células claras (mesonefróide)
- 2       • Benignos: adenofibroma
- 3       • *Borderline*
- 4       • Malignos: adenocarcinoma e carcinoma
- 5 • Tumores de Brenner
- 6       7. Benignos
- 7       8. *Borderline*
- 8       9. Malignos
- 9 • Tumores epiteliais mistos
- 10      10. Benignos
- 11      11. *Borderline*
- 12      12. Malignos
- 13 • Carcinomas indiferenciados
- 14 • Tumores epiteliais não especificados
- 15

## 16 Tumores dos cordões sexuais

- 17
- 18      1. Tumores da células granulosas-estromáticas
- 19      12. Tumores de células granulosas
- 20      13. Tumores do grupo tecoma-fibroma
- 21      2. Androblastomas (tumores de Sertólio-Leydig)
- 22      3. Ginandroblastomas
- 23      4. Não-classificados

1

## 2 Tumores de células lipóidicas

3

## 4 Tumores de células germinativas

5

- Disgerminomas

6

- Tumores do seio endodérmico

7

- Carcinoma embrionário

8

- Poliembrioma

9

- Coriocarcinoma

10

- Teratomas

11

- Imaturos

12

- Maduros

13

- Sólidos

14

- Císticos

15

- Cistos dermóides

16

- Cisto dermóide com transformação maligna

17.1. Especializados

18

- *Struma ovarii*

19

- Carcinóide

20

- Outros

21

- Formas mistas

22

## 23 Gonadoblastomas

1 a) Puros

2 b) Mistos

3

**4 Tumores de tecidos moles inespecíficos do ovário**

**5 Tumores não classificados**

**6 Tumores metastáticos**

**7 Lesões tumor-símiles**

8

9

- Luteoma gravídico

10

- Hiperplasia do estroma ovariano e hipertecose

11

- Edema maciço

12

- Cistos foliculares solitários e de corpo lúteo

13

- Ovários policísticos

14

- Cistos luteínicos múltiplos

15

- Endometriose

16

- Inclusões císticas da superfície epitelial

17

- Cistos simples

18

- Lesões inflamatórias

19

- Cistos paraovarianos

20

21

22

23

1

2

**ANEXO C**

3

4

**ESTADIAMENTO DA NEOPLASIA MALIGNA DE OVÁRIO (FIGO)**

5

6

a) IA: tumor restrito a um ovário, sem ascite, cápsula intacta

7

b) IB: tumor restrito aos dois ovários, sem ascite, cápsula intacta

8

c) IC: um ou dois ovários; citologia peritoneal positiva (células neoplásicas), implante ou cápsula rota

9

10

d) IIA: tumor acomete útero e/ou tuba uterina

11

e) IIB: qualquer tecido intra-pélvico

12

f) IIC: IIA ou IIB, citologia peritoneal positiva (células neoplásicas)

13

g) IIIA: histologia positiva, sem alterações macroscópicas

14

h) IIIB: nódulos de até 2 cm

15

i) IIIC: nódulos maiores que 2 cm; nódulos inguinais ou retroperitoneais positivos

16

j) IV: metástase à distância

17

18

19

20

21

22

23

1

2

**ANEXO D**

3

**SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS NA IMUNO-HISTOQUÍMICA**

4

5

**Tampão citrato de sódio**

6

7

1. 6,3g de ácido cítrico (1.00244.1000 – Merck)

8

2. 3.000ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destilada

9

3. Aproximadamente 39ml de hidróxido de sódio 2N para ajustar o pH (8 gramas de

10

NaOH, sodium hydroxide PA – 1064981000 – Merck, para cada 100ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

11

destilada)

12

4. Ajustar o pH da solução até atingir 6,0.

13

14

15

16

**Solução de BSA (albumina bovina)**

17

18

- 1,0 grama de BSA (albumin Bovine – A7906 Sigma)

19

- 100ml de PBS para uso

20

21

22

23

1

2

**PBS (tampão salino tamponado)**

3

4

## • Solução-mãe:

5

2. 105 gramas de fosfato de sódio monobásico (sódio fosfato 10,5g monobásico monoidratado – 1.06346.1000 – Merck)

6

7

3. 817 gramas de cloreto de sódio (Sodium Chloride – 1.06404.1000 - Merck). 81,7g

8

4. 36 gramas de fosfato monossódico (Fosfato Monossódico 1-hidrato-Art. 6346). 3,6g.

9

10

5. Ou fosfato de sódio dibásico dodeca hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

11

6. 10.000ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

12

## • Solução de uso:

13

1. 900ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

14

2. 100ml da solução-mãe

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1

**Tripsina**

2

3

a) 0,250g de tripsina (Tripsin – T – 7409 - Sigma)

4

b) 100ml de PBS para uso

5

**Obs: Separar em tubos de ensaio, contendo 5ml em cada (cada tubo é**

6

**suficiente para recuperar 40 lâminas, aproximadamente).**