UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PATOLOGIA HUMANA

CID ALMEIDA DE LIMA

GDF-15 TECIDUAL E SÉRICO EM NEOPLASIAS DE OVÁRIO

UBERABA - MG
2015

CID ALMEIDA DE LIMA

GDF-15 TECIDUAL E SÉRICO EM NEOPLASIAS DE OVÁRIO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração "Patologia Humana", da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Co-orientadores: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta e Profª. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta

UBERABA - MG
2015

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Lima, Cid Almeida de
L697g GDF-15 tecidual e sérico em neoplasias de ovário / Cid Almeida de Lima. -- 2015.
104 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientadora: Profª Drª Rosekeila Simões Nomelini
Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta
Profª Drª Beatriz Martins Tavares Murta

1. Neoplasias dos genitais femininos. 2. Fator 15 de diferenciação de crescimento. 3. Prognóstico. I. Nomelini, Rosekeila Simões. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.14-006

CID ALMEIDA DE LIMA

GDF-15 TECIDUAL E SÉRICO EM NEOPLASIAS DE OVÁRIO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração "Patologia Humana", da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Co-orientadores: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta e Profª. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta

12 de maio de 2015

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Rosekeila Simões Nomelini - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profª. Dra. Márcia Antoniazi Michelin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profª. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz
Universidade Federal de Uberlândia

“Deus está comigo, eu sinto no ar.
É como o vento a me tocar.
Passeia comigo, conversa comigo.
Revela segredos que só nEle há.
Me põe em seus planos, sou parte dos sonhos,
dos sonhos perfeitos que não falharão!
Deus está comigo eu posso sentir até as
batidas do Seu coração...”
(Anderson Freire)

Dedico este trabalho a todas as pacientes que contribuíram para a sua realização. Que lutaram e ainda lutam arduamente por suas vidas na esperança de que um dia a cura saia além das letras em um papel.

AGRADEÇO

***Aos meus pais Divino e Vania**, pelo apoio, carinho, amor, generosidade, companheirismo e dedicação, além da fé que depositaram em mim e em minha capacidade de vencer as barreiras e continuar sorrindo mesmo em dias tão tempestuosos.*

Sou feliz por lutarem comigo uma guerra que não lhes pertenciam, por orarem às madrugadas para que Deus me acompanhasse onde eu estivesse. Por me aconchegarem em seus braços quando precisei. Honrarei cada dia o amor, educação, fé, honestidade e moral que sempre me ensinaram.

Obrigado por serem canais de bênçãos dos céus sobre a minha vida. Amo muito vocês e esse amor é, acima de tudo, incondicional!

***A professora Dra. Rosekeila Simões Nomelini**, por ter acreditado em minha capacidade, por abrir oportunidades, pela paciência, força e fé. Pelo profissionalismo, humanização, seriedade e dedicação que sempre foram marcas do seu trabalho sendo espelho para mim e para tantos outros alunos e profissionais. Pela facilidade em solucionar os problemas que surgiram durante a realização deste trabalho. Sou grato por cada hora dedicada exclusivamente ao nosso trabalho, sendo uma "sumidade" em oncologia ginecológica.*

***Ao professor Dr. Eddie Fernando Candido Murta**, pela co-orientação nesse e em outros trabalhos já publicados, por demonstrar sempre profissionalismo e cordialidade, além da contribuição intelectual na realização desse conteúdo.*

***A professora Dra. Beatriz Martins Tavares Murta**, pela co-orientação e auxílio no delineamento do trabalho, por disponibilizar, sem reservas, todo espaço físico do laboratório de farmacologia.*

***Aos meus irmãos e sobrinhos**, pelo imenso amor e afeto que amorteceram a saudade que sinto todos os dias de estar com vocês. Obrigado por me acompanharem, mesmo estando quilômetros distantes, contudo com o coração bem perto. Sei que nosso amor é incondicional e vence todos os obstáculos. Eu amo vocês.*

***Ao Moisés Magela dos Reis**, por estar sempre comigo, dando apoio, segurança, incentivo e me encorajando, incansavelmente, principalmente nos momentos de maior precisão. Sua presença na execução desse trabalho foi extremamente importante. Sou grato pelo amor e proteção. Agradeço também a seus pais pela confiança, prestígio e cordialidade.*

***A minha eterna amiga-irmã Marcela Beghini**, que sempre apoiou minhas decisões. Por ter sido a base intelecto-científica que me impulsionou na realização de vários trabalhos científicos, por ter me acolhido em meio a tantas lágrimas, na saúde e na doença, mesmo com o coração apertado e angustiado, sendo fonte inesgotável de tanto amor sempre me impulsionando a vencer! Obrigado por tudo.*

***A professora Dra. Márcia Antoniazi Michelin**, por expor sem reservas seus conhecimentos sempre quando a consultei durante esse trabalho. Por abrir as portas do seu espaço científico com confiança. Pelo abraço amigo de todas as horas.*

***Ao Douglas Cobo Micheli** e equipe da farmacologia pela participação direta no armazenamento e processamento das amostras.*

***Ao Bioquímico Marcelo Costa Araújo**, e equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas - UFTM por dispor seu espaço físico para a consulta dos resultados dos marcadores e pelo auxílio à tantos outros trabalhos.*

***A Joelma Cristiane Silva** pela amizade, colaboração e prestatividade, atendendo sempre prontamente às listagens de prontuários a serem pesquisados.*

Aos meus parceiros de orientação pela execução em conjunto da coleta de material, na confecção das lâminas de imuno-histoquímica e realização do ELISA desse trabalho.

***A Universidade Federal do Triangulo Mineiro** (UFTM), onde realizou-se todo o trabalho.*

***Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq); **a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) e **a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais** (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.*

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de ovário é de difícil diagnóstico, sendo a principal causa de morte entre os tumores ginecológicos. O marcador tumoral GDF-15, membro da família TGF-β, é encontrado elevado no câncer de ovário, estando associado com invasão tumoral, metástases em linfonodos e pior prognóstico. Sua dosagem possui maior sensibilidade que demais marcadores em estádios iniciais do câncer, refletindo a extensão e o estádio da doença.

OBJETIVO: Avaliar os níveis séricos do marcador tumoral GDF-15 e coloração imuno-histoquímica de GDF-15 em pacientes com neoplasias benignas e malignas epiteliais primárias de ovário.

MÉTODOS: Sessenta e cinco pacientes foram avaliadas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, submetidas à cirurgia de acordo com critérios pré-determinados. As pacientes foram divididas em dois grupos: neoplasias benignas de ovário (n = 31), e neoplasias malignas primárias de ovário (n = 34). A imuno-histoquímica e estudo de ELISA foram realizados para avaliar o GDF-15 no tecido e no soro, respectivamente. Foi utilizado o teste exato de Fisher para comparar os resultados obtidos por imuno-histoquímica. Os níveis séricos de GDF-15 foram expressos como média e desvio padrão, e os valores foram comparados pelo teste t de "*student"* não pareado. Valores menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS: Os níveis séricos de GDF-15 foram mais elevados em doenças malignas do que em lesões benignas, mas não houve significância estatística. GDF-15 foi significativamente mais frequente no estroma de tumores malignos em comparação com tumores benignos (p = 0,0034). Não houve significância estatística na avaliação do epitélio.

CONCLUSÃO: Coloração imuno-histoquímica de GDF-15 é maior no estroma do câncer epitelial maligno de ovário em comparação com tumores benignos, indicando a importância do compartimento estromal em neoplasias de ovário.

Palavras-chave: GDF-15, tumores de ovário, fatores prognósticos, estroma peritumoral.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ovarian cancer is difficult to diagnose the main cause of death among gynecological tumors. The tumor marker GDF-15, a member of the TGF-β family, is found elevated in ovarian cancer is associated with tumor invasion, lymph node metastasis and worse prognosis. Your dosage has greater sensitivity than other markers in early stages of cancer, reflecting the extent and stage of the disease.

OBJECTIVE: The aims were to evaluate serum levels of GDF-15 and immunohistochemical staining of GDF-15 in patients with primary ovarian epithelial benign and malignant neoplasms.

METHODS: Sixty-five patients were evaluated in the Clinic of Pelvic Mass in the Discipline of Obstetrics and Gynecology/Oncology Research Institute (IPON) of the Federal University of Triangulo Mineiro, undergoing surgery according to predetermined criteria. The patients were divided into two groups: benign ovarian neoplasms (n = 31), and primary epithelial ovarian malignancies (n = 34). Immunohistochemistry study and ELISA were performed to evaluate GDF-15 serum and tissue, respectively. Fisher exact test was used to compare the results obtained by immunohistochemistry. Serum levels of GDF-15 were expressed as mean and standard deviation, and values were compared by Student's t-test. Values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS: Serum levels of GDF-15 were higher in malignancies than in benign neoplasms, but there was no statistical significance. GDF-15 was significantly more frequent in the stroma of malignant tumors compared with benign tumors ($p = 0.0034$). There is no statistical significance in epithelium evaluation.

CONCLUSION: GDF-15 immunohistochemical staining is higher in the stroma of malignant epithelial ovarian cancer compared to benign tumors, indicating the importance of stromal compartment in ovarian neoplasms.

Key-words: GDF-15, ovarian tumors, prognostic factors, peritumoral stroma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Intensidade 0 (zero) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15..... 57

Figura 2 - Intensidade 1 (um) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15..... 58

Figura 3 - Intensidade 2 (dois) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15..... 59

Figura 4 - Intensidade 3 (três) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15..... 60

Figura 5 - Frequência (%) dos tipos de estadiamento para câncer ovariano segundo os critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna..... 67

Figura 6 - Grau de diferenciação histológica das neoplasias malignas..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos dois grupos de pacientes comparados no estudo..... 64

Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia benigna..... 65

Tabela 3 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia maligna..... 66

Tabela 4 - GDF-15 Marcação Imuno-histoquímica no epitélio e estroma das neoplasias de ovário benignas e malignas..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AFP - Alfa-fetoproteína

ASCO - *American Society of Clinical Oncology*

BRCA1 - Gene supressor de tumor *breast cancer 1*

BRCA2 - Gene supressor de tumor *breast cancer 2*

CA-72.4 - Antígeno do câncer 72.4

CA-125 - Antígeno do câncer 125

CA-15.3 - Antígeno do câncer 15.3

CA-19.9 - Antígeno do câncer 19.9

CAFs - Fibroblastos Associados ao Câncer

CD - *Cluster of Differentiation*

CDK4 - *Cyclin-Dependent Kinase 4*

CEA - Antígeno carcinoembrionário

DCs - Células dendríticas

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FDA - *Food and Drug Administration* (Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América)

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GDF-15 - Fator de diferenciação do crescimento-15

HCl - Ácido Clorídrico

HE4 - Proteína humana 4 derivada do epidídimo

HRP - Estreptavidina conjugada com peroxidase

ICAM-1 - *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN-γ - Interferon gama

IgG - Imunoglobulina G

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-1β - Interleucina 1 beta

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IOTA - *International Ovarian Tumour Analysis*

IPON - Instituto de Pesquisa em Oncologia

LDH - Lactato desidrogenase

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

MIC-1 - *Macrophage Inhibitory Cytokine - 1*

MUC-1 - *Mucin 1, cell surface associated*

MUC-16 - Mucina 16

NK - Células *Natural Killer*

NKT - Linfócitos T *Natural Killer*

Oct4 - Octamer 4

PBS - Tampão salino fosfato

pH - Potencial Hidrogeniônico

TAG-72 - *Tumor-Associated Glycoprotein-72*

TAMs - Macrófagos associados a tumores

TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta

TIL - Linfócitos Tumor Infiltrantes

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral-α

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

β-hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO 21

1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO 24

1.2.1 Ultrassonografia transvaginal 25

1.3 MARCADORES TUMORAIS 26

1.3.1 CA-125 28

1.3.2 CA-19.9 29

1.3.3 CEA 30

1.3.4 CA-15.3 31

1.3.5 AFP 32

1.3.7 HE4 34

1.3.8 LDH 35

1.3.9 CA-72.4 36

1.3.10 Progranulina 37

1.3.11 Oct4 38

1.3.12 GDF-15 39

1.4 RESPOSTA IMUNE NO CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO 41

2. HIPÓTESE 47

3. OBJETIVOS 49

4. MATERIAIS E MÉTODOS 51

4.1 PACIENTES 52

4.1.1 Critérios de indicação de laparotomia exploradora 52

4.1.2 Caracterização dos grupos 53

4.1.3 Critérios de inclusão 53

4.1.4 Critérios de exclusão 53

4.2 MÉTODOS 54

4.2.1 Análise anátomo-patológica 54

4.2.2 Análise imuno-histoquímica 54

4.2.3 Análise imuno-enzimática 60

4.2.4 Análise estatística 62

4.2.5 Redação do texto 62

5. RESULTADOS 63

5.1 MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE GDF-15 68

5.2 NÍVEIS SÉRICOS DE GDF-15 69

6. DISCUSSÃO 70

7. CONCLUSÕES 79

REFERÊNCIAS 81

ANEXOS 95

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário é de difícil diagnóstico, sendo a principal causa de morte entre os tumores ginecológicos, devido a uma sintomatologia inespecífica e a falta de métodos de diagnóstico eficazes, o que dificulta a detecção precoce dessa neoplasia (HILPERT *et al.*, 2007; LANDEN JR. *et al.*, 2008; CLARKE-PEARSON, 2009; ROETT & EVANS, 2009; FEHM *et al.*, 2010).

A neoplasia maligna de ovário tem as menores taxas de sobrevivência entre os tumores ginecológicos, por ser predominantemente diagnosticada nos estádios mais avançados da doença (estádios III e IV) (HILPERT *et al.*, 2007; FEHM *et al.*, 2010; ALQASEMI *et al.*, 2012). Aproximadamente 5 a 10% dos tumores em estadiamento aparentemente inicial já apresentam metástases em linfonodos aórticos ou pélvicos (RUBIN, 1992; MURTA *et al.*, 1995).

Cerca de 21.290 novos casos são estimados para os Estados Unidos da América em 2015, com aproximadamente 14.180 mortes. O câncer de ovário é responsável por cerca de 5% de todos os cânceres entre as mulheres e sua incidência tem diminuído em 1,0% ao ano desde 1992. De 2007 a 2011, a taxa de mortalidade por câncer de ovário diminuiu 2,0% ao ano em mulheres brancas e ficou estável em mulheres negras (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No entanto, mais mulheres morrem de câncer de ovário do que de todos os outros tumores ginecológicos juntos (FISHMAN *et al.*, 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Cerca de 90% dos cânceres de ovário são esporádicos, ou seja, não apresentam fator de risco reconhecido. Cerca de 10% apresentam um componente genético ou familiar que leva a predisposição à doença (RISCH *et al.*, 2001). As mulheres que possuem mutações deletérias nos genes BRCA1 ou BRCA2 ou que possuem mãe ou irmã com mutação genética

representam o subgrupo com maior probabilidade de desenvolvimento do câncer de ovário (GAYTHER *et al.*, 1999; HORIUCHI *et al.*, 2003).

Entre as mulheres com mutações de BRCA1 (cromossomo 17q21), o risco tende a aumentar pouco antes dos 40 anos e, ao longo da vida, entre 25% a 40% (SCHMELER *et al.*, 2006). As mulheres portadoras de mutações no gene BRCA2 (cromossomo 13q12) também têm um importante risco de desenvolver câncer de ovário, cerca de 15 a 25%, embora esse risco não parece aumentar até pouco antes dos 50 anos de idade (SOCIETY OF GYNECOLOGIC ONCOLOGISTS, 2005; SCHMELER *et al.*, 2006).

As proteínas produzidas pelos genes BRCA1 e BRCA2 são consideradas guardiãs do genoma, e desempenham papeis importantes na sinalização de danos no DNA, ativação de reparo do DNA, indução de apoptose, e o monitoramento dos pontos de controle do ciclo celular. (VENKITARAMAN, 2002; YOSHIDA & MIKI, 2004; BOULTON, 2006). Células que não possuem o gene BRCA funcional mostram um aumento na aneuploidia, amplificação centrossômica e aberrações cromossômicas, que as tornam susceptíveis a novas mutações adicionais (ROSEN *et al.*, 2003).

BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumores que são herdados de maneira autossômica dominante (CHOBANIAN & DIETRICH, 2008). Portanto, a história familiar é o fator de risco isolado mais importante para o desenvolvimento do câncer de ovário (PANET & KHORANA, 1974; LERMAN *et al.*, 1998; LIPKUS *et al.*, 2001; REBBECK *et al.*, 2002).

Todas as células do ovário humano podem sofrer transformação maligna: células epiteliais, células estromais e células germinativas, mas aproximadamente 80 a 90% das neoplasias malignas ovarianas são derivadas do epitélio superficial (MOK *et al.*, 2007).

Estudos demonstraram que as tubas uterinas, ao serem cuidadosamente examinadas, confirmam que pequenos focos de carcinomas tubários podem estar invadindo o epitélio ovariano tanto em mulheres com uma predisposição genética para o desenvolvimento de

câncer de ovário, como também naquelas sem mutações conhecidas no gene BRCA (FINCH *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2006; CALLAHAN *et al.*, 2007; KINDELBERGER *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; PRZYBYCIN *et al.*, 2010), sugerindo uma das teorias atuais da ocorrência da doença. Ainda em outros estudos, foi possível verificar que a presença dos tumores serosos estavam quase sempre detectados nas fímbrias e tem sido proposto que a primeira mudança neoplásica começaria nas células do tipo secretoras (MEDEIROS *et al.*, 2006; KINDELBERGER *et al.*, 2007).

Os tumores epiteliais são classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Os tumores epiteliais pouco diferenciados estão associados com pior prognóstico.

Os tumores derivados do epitélio ainda podem ser classificados em invasores e não-invasores (*borderline*). Os tumores *borderline* representam 20% dessa categoria e estão associados a melhor prognóstico, porém os tumores *borderline* serosos com característica micropapilar apresentam uma maior chance de recidiva comparado aos mesmos sem características micropapilar (MIRONOV *et al.*, 2007).

A sobrevida em 5 anos para pacientes diagnosticadas em estádio I varia entre 80 e 90%, enquanto que, para pacientes em estádio III e IV, varia de 5 a 50%. Atualmente, aproximadamente, 60 a 65% das pacientes, encontram-se em estádio III no momento do diagnóstico, justificando a elevada letalidade dessa neoplasia (MIRONOV *et al.*, 2007).

Apesar do tratamento adequado, 75% dos casos apresentam recorrência da doença, muitos dos quais ocorrem nos dois primeiros anos após o tratamento quimioterápico (MORIKAWA *et al.*, 1993; GADDUCCI *et al.*, 2007). Pacientes com câncer epitelial de ovário recorrente apresentam um prognóstico reservado, com sobrevida média menor que 2 anos e sobrevida global em 5 anos menor que 10% (GADDUCCI *et al.*, 2005).

Nuliparidade, ausência de amamentação, menopausa tardia, parentes diretos (mãe ou irmã) com câncer de ovário ou câncer de mama (TOGASHI, 2003; VRABIE *et al.,* 2008), sobrepeso ou obesidade (FAIRFIELD *et al.,* 2001; SCHOUTEN *et al.,* 2008; DOTLIĆ *et al.,* 2011), são fatores de risco para a ocorrência de neoplasia maligna ovariana, sendo sua maior incidência em mulheres acima dos cinquenta anos de idade (VRABIE *et al.,* 2008).

Por outro lado, existem fatores que limitam, ou que diminuem o risco da doença, tais como: a inibição ou parada da ovulação habitual, seja por gravidez ou contracepção (WHITTEMORE *et al.,* 1992; RISCH, 1998; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1999; RIMAN *et al.,* 2002; CLARKE-PEARSON, 2009), por cinco ou mais anos, que reduz em até 50% a chance de desenvolver o câncer (RISCH *et al.,* 1983); aumento no tempo de lactação (GWINN *et al.,* 1990; CLARKE-PEARSON, 2009); multiparidade (WOOSTER *et al.,* 1994; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1999; WERNESS *et al.,* 2000; CLARKE-PEARSON, 2009), ou cirurgia prévia de histerectomia ou laqueadura tubária (SCHILDKRAUT & THOMPSON, 1988).

1.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Os métodos mais utilizados para diagnosticar os tumores ovarianos são: marcadores sorológicos tumorais que podem apresentar positividade tanto no soro, no lavado peritoneal quanto no líquido intracístico de pacientes com tumores epiteliais malignos e benignos de ovário (CHERCHI *et al.,* 2002), além do uso da ultrassonografia transvaginal que auxilia na diferenciação entre tumores neoplásicos e não neoplásicos (TAVARES-MURTA *et al.,* 2004), associada ao *Color Doppler* que pode ser utilizado na avaliação das massas ovarianas e na diferenciação entre benignidade e malignidade pela observação do índice de resistência e

índice de pulsatilidade do fluxo sanguíneo nas regiões tumorais (OHEL *et al.*, 2010; ZHANG & ZHANG, 2015).

1.2.1 Ultrassonografia transvaginal

A literatura tem relatado que no decorrer dos últimos anos houve mudanças significativas na realização e interpretação do ultrassom ginecológico, e esse exame tem se mostrado muito útil e preciso no diagnóstico do câncer de ovário, embora seus resultados ainda sejam subjetivos (BAERT *et. al.,* 2015).

Durante a última década, grandes progressos foram feitos na busca de se padronizar e aperfeiçoar a classificação das massas anexiais, através dos exames de ultrassonografia, pelo grupo IOTA (*International Ovarian Tumour Analysis*) (NUNES *et al.,* 2014).

Dados recentes da literatura demonstraram que a elaboração e execução de um novo protocolo denominado ADNEX aprimorou ainda mais a utilização do exame de imagem, na detecção de massas anexiais, onde clínicos e estatísticos através de um estudo de meta-análise, selecionaram 5.909 mulheres em 24 centros em 8 países da Europa, China e Canadá com suspeita de acometimento do câncer de ovário. Através dos modelos matemáticos desenvolvidos pelo grupo ADNEX foi possível prever o diagnóstico das quatro categorias principais do câncer de ovário: tumores benignos, tumores *borderline*, tumores primários de ovário e câncer metastático secundário (VAN CALSTER *et al.*, 2014).

O estudo foi fundamentado seguindo protocolo específico e uniformizado de acordo com a seleção das seguintes variáveis: 1. Quatro variáveis clínicas: idade, nível sérico de CA-125, história familiar de câncer de ovário e tipo de centro médico (centro de oncologia contra outros hospitais); 2. Seis variáveis de ultrassom: diâmetro máximo da lesão, proporção de

tecido sólido (sendo, o diâmetro máximo do maior componente sólido dividido pelo diâmetro máximo da lesão), a presença de mais de 10 lóculos císticos, o número de projeções papilares, presença de sombras acústicas e presença de ascite. Segundo os pesquisadores o novo modelo ADNEX otimiza a abordagem das mulheres com alguma massa anexial e a adoção do protocolo pelo ultrassonografista e a interpretação dos resultados pelo oncologista são cruciais para a determinação do diagnóstico e tratamento das portadoras de neoplasia ovariana, além disso, o ADNEX oferece excelente discriminação entre tumores benignos e malignos, podendo esse modelo prever o tipo de malignidade (VAN CALSTER *et al.,* 2014).

O conhecimento do tipo específico de doenças anexiais, antes da cirurgia é altamente susceptível, melhorando a triagem do paciente, e também torna possível o favorecimento do tratamento. Este, por sua vez, pode reduzir a morbidade e levar a um aumento da sobrevida em diferentes tipos de tumores malignos do ovário. (VAN CALSTER *et al.,* 2014).

Segundo Nunes *et al.* 2014, em centros de diagnóstico onde os protocolos atuais não forem possíveis de serem utilizados, a interpretação da ultrassonografia pélvica transvaginal por especialista deve ser empregada.

Os estudos publicados demonstram que a evolução do exame de imagem na avaliação das pacientes com massas anexiais vem se tornando promissora no decorrer dos últimos 10 anos.

1.3 MARCADORES TUMORAIS

Os marcadores tumorais têm sua importância no diagnóstico de neoplasia ovariana, pois são substâncias que podem ser encontradas e quantificadas no sangue ou em outros fluidos orgânicos de pacientes portadores de neoplasias (REIS, 2005).

Um marcador tumoral pode ser produzido pelo próprio tumor, em resposta à presença do câncer (MATTOS *et al.*, 2005). Testes para marcadores tumorais podem ser realizados isoladamente ou associados com exames de imagem, para detectar e diagnosticar alguns tipos de câncer (REIS, 2005).

Os níveis séricos dos marcadores tumorais devem refletir com precisão a evolução clínica e a regressão da doença, e a normalização dos seus níveis deve estar associada à cura (REIS, 2005).

Devem ser sensíveis e específicos e ainda apresentar níveis proporcionais ao tamanho do tumor, no estabelecimento do prognóstico e na detecção precoce de recorrência (ALMEIDA *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2009; EDGELL *et al.*, 2010).

Os marcadores tumorais séricos de rotina utilizados na prática clínica para a avaliação de neoplasias ovarianas são: Antígeno Carcinoembrionário (CEA), CA-125, CA-19.9, CA-15.3, Alfa-fetoproteína (AFP) e Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β (β-hCG).

Estudos mostram que outros marcadores podem ser usados para auxiliar no diagnóstico das neoplasias ovarianas tais como: Proteína Humana 4 derivada do Epidídimo (HE4) (URBAN & DRESCHER, 2008; MOORE *et al.*, 2009), Fator de Diferenciação do Crescimento-15 (GDF-15) (STAFF *et al.*, 2010; BOCK *et al.*, 2010), CA 72.4 (GADDUCCI *et al.*, 2004; MOR *et al.*, 2005), Octamer - 4 (Oct4) (ABIKO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010), Lactato Desidrogenase (LDH) (SCHNEIDER *et al.*, 1997; SIMAGA *et al.*, 2005) e Progranulina (HAN *et al.*, 2011; DIAZ-CUETO *et al.*, 2012).

1.3.1 CA-125

O CA-125 é o biomarcador mais utilizado para triagem, acompanhamento pós-cirúrgico e recidiva no câncer ovariano (GUIMARÃES *et al.,* 2002; KIM *et al.,* 2014). É formado por uma glicoproteína de alto peso molecular, que foi inicialmente identificada por meio de anticorpos produzidos por animais imunizados com células de cistoadenocarcinoma seroso papilífero do ovário humano (BAST *et al.,* 1981). Sua sensibilidade para o diagnóstico de câncer de ovário é de 80% a 85% no tipo epitelial, variando de acordo com o estadiamento, sendo 50% no estádio I, 90% no estádio II, 92% a 94% nos estádios III e IV (JACOBS & BAST, 1989).

A elevação sérica do CA-125 pode ocorrer de dois a doze meses antes de qualquer evidência clínica do aparecimento do câncer (ALMEIDA *et. al.,* 2004). Existe uma série de limitações encontradas na detecção desse marcador no câncer de ovário. O CA-125 pode apresentar aumento dos níveis séricos em várias situações clínicas como: cirrose com ascite, cistos de ovário, endometriose, hepatite, pancreatite, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer colorretal e inflamações pélvicas (EAGLE & LEDERMANN, 1997).

Esse marcador apresenta baixa sensibilidade para a detecção de neoplasias em estádio inicial, sendo apenas de 50% no estádio I (JACOBS & BAST, 1989; NUSTAD *et al.,* 1996) e um alto custo para as populações de baixa renda (ALMEIDA *et al.,* 2007). No entanto, a dosagem de CA-125 associado com ultrassonografia transvaginal vem sendo promissor na avaliação das pacientes com suspeita de câncer de ovário, principalmente aquelas com história familiar associada (EAGLE & LEDERMANN, 1997; OLIVER *et al.,* 2006).

Estudos têm sugerido que o CA-125 pode ser um fator prognóstico e foi demonstrado que esse marcador se correlacionou com o estadiamento da FIGO, porém não foi visto relação

com a idade, o grau, a doença residual após cirurgia e intervalo livre de doença (ROSSI *et al.*, 2004). Outros pesquisadores avaliaram o risco de recidiva de câncer epitelial de ovário em pacientes com níveis séricos de CA-125 menor que 35μU/mL, e demonstraram que um aumento progressivo de seus valores, mesmo ainda em níveis normais, poderia ser indicativo de recorrência da doença (SANTILLAN *et al.*, 2005).

Paramasivam *et al.* (2005) demostraram que o estadiamento cirúrgico completo, o grau histopatológico e os níveis pré-operatórios de CA-125 são fatores prognósticos independentes e poderiam ser incluídos como fatores de decisão na realização de quimioterapia.

1.3.2 CA-19.9

O CA-19.9 é um marcador de superfície celular, com peso molecular variando de 200 a 1000kDa, é também conhecido como Antígeno de Lewis (GUIMARÃES *et al.*, 2002). É um monossialogangliosídeo secretado por tumores mucinosos do trato gastrointestintal, incluindo pâncreas e vias biliares (MOTOYAMA *et al.*, 1990). É liberado na superfície da célula neoplásica e penetra na corrente sanguínea, onde pode ser detectado. O CA-19.9 tem como vantagem a alta sensibilidade para identificar o câncer epitelial de ovário subtipo mucinoso (GADDUCCI *et al.*, 2004).

Os fatores prognósticos associados às concentrações séricas de CA-19.9 no câncer de ovário ainda não foram bem estabelecidos na literatura.

Níveis séricos elevados são encontrados ocasionalmente em pacientes com câncer epitelial de ovário ou tumor de células germinativas, em especial as neoplasias epiteliais do tipo mucinoso, ou tumores de células germinativas com componente mucinoso associado,

contudo a normalização sérica desse marcador é esperada após a citorredução (DEDE *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Cho *et al.* (2013), os autores evidenciaram um aumento significativo de CA-19.9 nas amostras analisadas de teratoma cístico maduro, mostrando que esse marcador pode ser uma ferramenta potente no auxilio do diagnóstico desse tipo de tumor. Dede *et al.* (2006) demonstraram que o aumento dos níveis de CA-19.9 associados com CA-125 podem ser fortes indicativos de bilateralidade do teratoma cístico maduro em mulheres com idade fértil, sendo o CA-19.9 um dos marcadores mais importantes para o diagnóstico desse tipo de tumor tanto em condições benignas como malignas.

No entanto a análise isolada desse marcador, quando há valores elevados de CA-125, para diagnóstico, não oferece qualquer benefício adicional no monitoramento do câncer de ovário (GADDUCCI *et al.*, 2004).

1.3.3 CEA

O CEA é uma glicoproteína com peso molecular de 180kDa pertencente à família dos genes das imunoglobulinas. Tem como função principal a adesão hemolítica intracelular, que promove a agregação nos carcinomas gastrointestinais, onde foi inicialmente identificado (AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY - ASCO, 1996).

Níveis elevados de CEA são encontrados em neoplasias malignas, como por exemplo, de cérvice uterina (42% a 50%) mama (30% a 50%), pulmão (52% a 77%), pâncreas (61% a 68%), trato gastrintestinal (40% a 60%), vias biliares (80%) e tireóide (50% a 70%) (ZHANG *et al.*, 2010).

Concentrações séricas isoladas de CEA são amplamente utilizadas no prognóstico dos pacientes com neoplasias gastrointestinais (AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY - ASCO, 1996), e a associação do CEA com outros marcadores pode ser um bom método de estudos para distintos tipos de câncer (HE *et al.,* 2013; KONDALSAMY-CHENNAKESAVAN *et. al.,* 2013).

1.3.4 CA-15.3

O CA 15.3 é uma glicoproteína de 300 - 400kDa, codificada pelo gene MUC-1, produzida pelas células epiteliais glandulares (SCHWARTZ, 1993). A sensibilidade na dosagem desse marcador varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico, sendo de 88% a 96% na doença disseminada (GERAGHTY *et al.*, 1992).

O CA-15.3 diminui a adesão das células cancerosas entre si e a adesão entre as células cancerosas e a matriz extracelular através da alteração do seu citoesqueleto, promovendo a liberação de células cancerosas da lesão primária. Além disso, o CA-15.3 se liga em receptores específicos dispostos na superfície das células endoteliais (ICAM-1), aumentando a adesão entre as células heterogêneas, conduzindo à invasão das células cancerosas na parede vascular, favorecendo metástases subsequentes (HORM & SCHROEDER, 2013).

Células cancerosas altamente metastáticas são normalmente muito resistentes à quimioterapia, ocorrendo em cerca de 90% das pacientes com câncer epitelial de ovário metastático (AGARWAL & KAYE, 2003), portanto um aumento na concentração sérica de CA-15.3 no câncer epitelial de ovário poderia predizer uma possível resistência do tumor aos medicamentos administrados (ZHANG *et al.*, 2013).

Níveis elevados de CA-15.3 no soro de pacientes com câncer de mama, por exemplo, estão correlacionados com tumores de alto grau de diferenciação, comprometimento de linfonodos e presença de metástases à distância (HORM & SCHROEDER, 2013).

Altos níveis desse marcador são constantemente encontrados em tumores que produzem metástases (HORM & SCHROEDER, 2013), tornando sua dosagem extremamente importante nos períodos iniciais do tratamento.

1.3.5 AFP

A AFP é uma proteína do soro fetal que é sintetizada no fígado, saco vitelino e intestino do feto e é uma das principais proteínas carcinoembrionárias, com funções de transporte plasmático e de manutenção da pressão oncótica. Sua concentração no soro fetal diminui completamente até o primeiro ano de vida (ALMEIDA *et al.*, 2007). É uma proteína amplamente utilizada como marcador de neoplasias hepáticas e em um tipo específico de carcinoma gástrico.

Níveis elevados de AFP são mais comumente observados em tumores de células germinativas em mulheres jovens, sendo a ocorrência de seu aumento sérico em mulheres na pós-menopausa ainda raro (MEGURO & YASUDA, 2013). Níveis elevados de AFP sugerem fortemente a presença de câncer de células germinativas (SCHWARTZ, 1993), carcinoma ovariano hepatóide (ISONISHI *et al.*, 2009) e tumores do seio endodérmico (ALMEIDA, 2004).

O aumento dos níveis séricos de AFP para valores positivos pode indicar recidiva, mesmo sem sinais clínicos de recorrência da doença (KAWAI *et al.*, 1990). No entanto, o clínico deve sempre buscar um diagnóstico diferencial, uma vez que, a AFP pode elevar seus

níveis séricos em outras situações como: hepatites, cirrose e gestação (ALMEIDA *et al.*, 2007).

1.3.6 β-hCG

A Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β (β-hCG) é uma glicoproteína com 24 - 34kDa normalmente secretada pela placenta durante a gravidez. Tem sido demonstrado que a β-hCG é um excelente marcador tumoral utilizado para diagnóstico, monitorização e prognóstico de pacientes com tumores de células germinativas (ALMEIDA, 2004).

Um desses tumores é o coriocarcinoma primário de ovário, que é a neoplasia maligna mais rara derivada das células germinativas, tendo um potencial metastático elevado sendo mais prevalente em mulheres em idade fértil (EXMAN *et. al.*, 2013).

A ocorrência do coriocarcinoma primário de ovário é extremamente baixa, sendo 1 caso em 369 milhões de gestações para o tipo gestacional e menor que 0,6% de todas as neoplasias ovarianas para o tipo não-gestacional (LV *et. al.*, 2011).

A diferenciação entre coriocarcinoma gestacional e não-gestacional têm sido um desafio para os oncologistas, visto que, o último é mais agressivo, possui maior resistência à quimioterapia e pior prognóstico, no entanto, suas características sintomatológicas e histológicas são semelhantes na faixa etária reprodutiva (EXMAN *et. al.*, 2013).

Níveis séricos aberrantes da β-hCG são altamente sugestivos para o diagnóstico do coriocarcinoma primário de ovário (>16.000 mUI/mL) e a normalização sérica desse marcador durante o tratamento está relacionado à boa resposta terapêutica (EXMAN *et. al.*, 2013).

O uso da β-hCG também tem grande utilidade na predição da agressividade dos tumores epiteliais ovarianos, onde níveis elevados desse marcador evidencia prognóstico ruim e menor sobrevida das pacientes (VARTIAINEN *et al.,* 2001).

1.3.7 HE4

A proteína HE4 foi descrita pela primeira vez por Kirchhoff *et al.* (1991), sendo originalmente encontrada no epitélio do epidídimo humano, desempenhando um papel importante na maturação dos espermatozóides. A HE4 é encontrada também no tecido saudável da traquéia, glândulas salivares e com uma menor proporção no pulmão, nos rins e na tireóide. Ela também é abundante em alguns adenocarcinomas pulmonares e de mama (GALGANO *et al.,* 2006).

É um marcador novo e sua secreção é detectada em altos níveis no soro de pacientes com câncer de ovário, uma vez que está presente nas células neoplásicas do câncer epitelial de ovário (LAMY *et al.,* 2010). Sua concentração não é elevada nas neoplasias benignas, como visto com os níveis de CA-125, o que amplia seu uso para o auxílio no diagnóstico dos tumores epiteliais malignos (HELLSTRÖM *et al.,* 2003).

A HE4 apresenta alta sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença, sendo mais específico e sensível do que CA-125. Estudos têm demonstrado a sua utilidade em combinação com CA-125 para a detecção do câncer epitelial de ovário maligno em mulheres com massa pélvica (MOORE *et al.,* 2009), onde a combinação de HE4 e CA-125 aumentam a sensibilidade e especificidade na detecção das neoplasias (DRAPKIN *et al.,* 2005). Em um estudo publicado recentemente os pesquisadores demonstraram a importância da HE4 no

diagnóstico do câncer de ovário em pacientes jovens evidenciando sua alta especificidade para o diagnóstico da doença (WANG *et al.*, 2014).

A HE4 foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para monitorar a doença recorrente ou progressiva em pacientes com câncer epitelial de ovário, sendo a utilização desse marcador promissor para a detecção precoce dos tumores malignos e metastáticos (LAMY *et al.*, 2010).

Altos níveis séricos do marcador tumoral HE4 é um indicador forte e independente de pior prognóstico em pacientes com câncer epitelial de ovário (STEFFENSEN *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Trudel *et al.* (2012) demonstrou que níveis plasmáticos pré operatórios elevados de HE4 estão relacionados, com a agressividade, prognóstico ruim e maiores índices de mortalidade nas pacientes com câncer de ovário, onde esses níveis foram encontrados em pacientes com idade avançada, em estádios avançados da doença e com tumores moderadamente ou pouco diferenciados. Os autores ainda relataram que as concentrações maiores de HE4 podem ser encontradas nos tumores do subtipo seroso e essas concentrações plasmáticas estavam melhor associadas com prognóstico e mortalidade do que os níveis de CA-125, deixando clara a importância desse marcador como fator prognóstico no câncer de ovário.

1.3.8 LDH

A LDH é uma enzima que catalisa a reação final da glicólise, atuando na redução de piruvato em lactato, gerando energia para as células (SIMAGA *et al.*, 2005) e está fisiologicamente presente no tecido muscular cardíaco e esquelético, onde o consumo energético é naturalmente mais acentuado (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Pacientes com tumores malignos mostram frequentemente uma elevação da concentração sérica de LDH, isso ocorre devido ao aumento do metabolismo das células cancerosas que consequentemente efetuam uma alta taxa de glicólise (SIMAGA *et al.*, 2005).

Níveis séricos de LDH podem estar elevados em determinadas doenças como: infarto do miocárdio, mononucleose infecciosa e hepatite aguda. Podem ainda ter um aumento dos níveis em pacientes com leucemia e linfoma, carcinoma do esôfago, pâncreas, vesícula biliar, e de mama e também carcinoma da próstata, da bexiga urinária e testículo (AWAIS, 1973).

A enzima ganha um papel importante quando se busca diagnosticar disgerminoma ovariano e tumores de células germinativas, possuindo concentrações significativamente mais elevadas em tumores malígnos quando comparados às neoplasias benígnas. (SIMAGA *et al.*, 2005). Schneider *et al.* (1997) também destacaram sua importância no diagnóstico de cistadenocarcinoma seroso, onde a dosagem apartir do lavado peritoneal estava consideravelmente aumentada.

A dosagem de LDH no soro ou lavado peritoneal pode ser usada para discriminar a origem da massa anexial, grau de diferenciação histológico, estádio avançado da doença e citologia positiva em lavado peritoneal, onde sua detecção está confiavelmente relacionada com um prognóstico ruim nas pacientes com câncer maligno de ovário (YÜCE *et al.*, 2001), seu uso também tem sido útil para a monitorização da resposta à quimioterapia ou recidiva da doença (CECIL & AUSIELLO, 2005).

1.3.9 CA-72.4

A glicoproteína antigênica CA-72.4 é também denominada TAG-72 (*Tumor-Associated Glycoprotein-72*), que faz parte de um complexo de glicoproteínas membrano-

mucinas (MUC-1). Possui peso molecular de aproximadamente 240 - 400kDa e pode ser detectada no soro de pacientes com vários tipos de adenocarcinomas que ocorrem no cólon, estômago, esôfago, ovário, pâncreas, mama, e pulmão.

Tem sido demonstrado que CA 72.4 tem um papel importante na malignidade tumoral e na expansão do câncer por favorecer a invasão metastática em tumores em estádio avançado (ZHANG *et al.*, 2012).

CA 72.4 não é expressa em tecidos normais, com exceção do endométrio na fase secretora do ciclo menstrual (PONNUSAMY *et al.*, 2007). Este marcador tumoral está elevado em carcinomas ovarianos, principalmente no subtipo mucinoso de ovário (GUADAGNI *et al.*, 1994), o que o torna uma ferramenta auxiliar muito importante para a triagem e seguimento de pacientes com esse tipo de tumor, além de ser promissor para terapias imunogênicas direcionadas (PONNUSAMY *et al.*, 2007).

1.3.10 Progranulina

A Progranulina ou epitelina é uma glicoproteína isolada sericamente com peso molecular de 88kDa, secretada por células epiteliais, possui atividade pro-inflamatória, além da estimulação do crescimento do tumor, como também melhora a migração, capacidade de invasão, transformação, independência de ancoragem, e quimiorresistência das células tumorais (DE MUYNCK & VAN DAMME, 2011).

A Progranulina possui alta expressão em células epiteliais, certos tipos de neurônios, macrófagos e em uma ampla variedade de outros tecidos e tipos de células, incluindo músculo esquelético, condrócitos, tecido adiposo, células hematopoiéticas e células do sistema imune incluindo linfócitos T e células dendríticas. Tem sido largamente estudada nos campos das

doenças infecciosas, cicatrização de feridas, tumorigênese, e doenças neurodegenerativas (CENIK *et al.,* 2012; JIAN *et al.,* 2013), bem como nos estudos de angiogênese e neo-angiogênese (TOH *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Koo *et al.* (2012) demonstrou que a Progranulina tem um papel importante no câncer de mama, uma vez que é um fator que marca um prognóstico ruim nas pacientes, porque pode inibir a apoptose induzida por quimioterápicos, alterando o crescimento de células estrógeno-dependentes.

A Progranulina é conhecida por estimular a proliferação e sobrevivência de vários tipos de células cancerosas, inibindo a apoptose dessas células através da ativação por vias da proteína quinase ativada por mitose (ERK1/2), fosfatidilinositol 3-quinase e quinase de adesão focal, que conduz à ativação de proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como ciclina D1, ciclina B e CDK4 (SERRERO *et al.,* 2012).

Seus níveis podem estar elevados em vários tipos tumorais incluindo o de mama (KOO *et al.,* 2012), da próstata (MONAMI *et al.,* 2009), renal (DONALD *et. al.,* 2001), do fígado (HO *et al.,* 2008) e gastrointestinais (DEMORROW, 2013), além do câncer de ovário, onde está relacionado intimamente com fenótipo agressivo, mau prognóstico, malignidade, quimiorresistência, e sobrevivência global reduzida, levando a hipótese de que a Progranulina pode ser um bom marcador para doenças com alto grau de ocultismo (HAN *et al.,* 2011; DIAZ-CUETO *et al.,* 2012).

1.3.11 Oct4

O Oct4 é um marcador sensível que apresenta níveis aumentados especificamente nos carcinomas ovarianos serosos e mucinosos, sendo o subtipo histológico seroso o que

apresenta maior incidência de positividade. (ZHANG *et al.,* 2010). É conhecido por desempenhar um papel crucial na manutenção da pluripotência e no potencial da linha germinativa de células-tronco embrionárias pluripotentes (PESCE *et al.,* 1998).

Estudos têm demonstrado expressão de Oct4 em carcinoma humano embrionário, tumor de células germinativas testiculares, seminoma, glioma, carcinoma gástrico e de mama, câncer de pulmão e bexiga (EZEH *et al.,* 2005; SUNG *et al.,* 2006; CHEN *et al.,* 2009; DU *et al.,* 2009; KAROUBI *et al.,* 2009).

Um estudo realizado por Hochedlinger *et al.* (2005) que investigou o efeito da expressão de Oct4 em tecido somático de camundongos adultos, demonstrou que a ativação do Oct4 resultou em displasia dos tecidos epiteliais, havendo também, inibição da diferenciação celular o que poderia levar a um aumento significativo do potencial dessas células em assumir características de células malignas. Os autores ainda observaram que o Oct4 exercia no epitélio a mesma ação observada em células germinativas.

A presença da expressão de Oct4 nas amostras de teratomas imaturos de alto grau analisadas por Abiko *et al.* (2010), indica que esse marcador poderá ser promissor no diagnóstico de casos de teratomas imaturos altamente malignos.

1.3.12 GDF-15

O GDF-15 também chamado de MIC-1 (*Macrophage Inhibitory Cytokine - 1*), é um membro distante da superfamília TGF-β, sendo originalmente identificado em linhagens celulares de macrófagos ativados (BOOTCOV *et al.,* 1997).

O GDF-15 é induzido por citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL)-1β, IL-2, IL-6, Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e fator estimulante de colônias de

macrófagos (BOOTCOV *et al.,* 1997). Seu aumento está associado a situações patológicas relacionadas à inflamação, lesão tecidual aguda e ocorrência de malignidade em neoplasias (STAFF *et al.*, 2010).

A presença de GDF-15 no microambiente tumoral pode inibir a secreção do TNF-α por macrófagos ativados (BOOTCOV *et al.,* 1997), o que consequentemente, leva a diminuição da destruição das células tumorais (KARAN *et al.*, 2009).

O GDF-15 em geral pode atuar como uma proteína supressora do tumor, inibindo o crescimento tumoral e induzindo a apoptose nas estádios iniciais do câncer (MIMEAULT & BATRA, 2010), no entanto, tem sido descrito na literatura que este marcador pode promover a quimiorresistência, proliferação, migração e invasão, além de metástases em tecidos distantes das células cancerosas em estádios avançados da doença (MIMEAULT & BATRA, 2010). O GDF-15 funciona como um regulador autócrino da ativação dos macrófagos (BOOTCOV *et al.,* 1997).

Sua expressão é abundante no tecido placentário e esse é o único tecido onde há uma maior concentração de GDF-15 em condições fisiológicas normais (LAWTON *et al.,* 1997), contudo, uma elevação sérica exacerbada e constante na gravidez pode apresentar riscos aumentados da ocorrência de pré-eclampsia e diabetes *mellitus* gestacional, condições estas que estão intinmamente associadas a risco de doenças cardiovasculares em mulheres gestantes (SUGULLE *et al.,* 2009).

Concentrações elevadas de GDF-15 também têm sido associadas a um aumento do risco da ocorrência de doenças cardiovasculares em mulheres em idade avançada (BROWN *et al.,* 2002).

Dados descritos na literatura mostram que o marcador tumoral GDF-15 foi encontrado em níveis elevados em lesões malígnas de próstata, tireóide, pâncreas, bem como no carcinoma colorretal e no melanoma maligno. Foi observado também que ele está elevado

em mulheres com carcinoma de ovário, e que o aumento dos seus níveis está associado a um prognóstico ruim, sendo então, o GDF-15 um marcador de prognóstico potencialmente útil no carcinoma ovariano (STAFF *et al.,* 2010).

1.4 RESPOSTA IMUNE NO CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO

O câncer epitelial de ovário não é considerado um tumor imunogênico, como o observado no melanoma, em tumores renais ou mesmo em doenças hematológicas (LAVOUÉ *et al.,* 2013). Os dados experimentais mostram que o microambiente inflamatório do câncer epitelial de ovário impede a maturação de células mielóides, favorece o desenvolvimento das células reguladoras e suprime a atividade citotóxica de linfócitos efetores, levando o tumor ao escape do sistema imunológico e desencadeando a progressão do câncer (CUBILLOS-RUIZ *et al.,* 2010).

Há várias teorias que descrevem o funcionamento e a relação do sistema imunológico sobre as células tumorais e suas respectivas moléculas sinalizadoras, contudo, não é possível ainda descrever em detalhes o papel da resposta imune frente ao câncer epitelial de ovário, por existirem atuações distintas das células imunes como os linfócitos T onde pode-se observar comportamentos diferentes de uma mesma célula, levando à proliferação ou inibição do crescimento tumoral (KNUTSON *et al.,* 2003; ZHANG *et al.,* 2003).

Tem sido descrito na literatura que algumas células como os linfócitos T regulatórios (Treg) CD4+ CD25+ FOXP3+ atuam como células imunossupressoras de tumores aumentando a tolerância do sistema imune à auto-antígenos (RUDENSKY, 2011), podendo alterar a resposta dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) administrados nas pacientes em tratamento contra o câncer

de ovário, podendo ainda levar à supressão de células que naturalmente atacariam os tecidos tumorais como os linfócitos T CD4+ *in vivo* e *in vitro* (KNUTSON *et al.,* 2003).

Por outro lado existem células efetoras da resposta imunológica antitumoral que participam diretamente na apresentação dos antígenos tumorais e/ou no ataque a essas células, esse grupo inclui os linfócitos T CD4, T CD8+, células *Natural Killer* (NK), linfócitos T *Natural Killer* (NKT), Células Dendríticas (DCs) e linfócitos T CD3+ (TIL - Linfócitos Tumor Infiltrantes) (KNUTSON *et al.,* 2003; ZHANG *et al.,* 2003).

Zhang *et al.* (2003), destacaram em seu trabalho que a presença de linfócitos T CD3+ no estroma tumoral, em 54,8% de suas pacientes, estava intimamente correlacionado com melhor sobrevida, deixando evidente a hipótese de que essas células podem ser responsáveis pelo reconhecimento de antígenos tumorais, sugerindo que as células TIL podem ser um marcador de resposta antitumoral, visto que, estão presentes em aproximadamente metade das pacientes com carcinoma de ovário avançado (estádios III e IV), por outro lado as pacientes que tiveram marcações ausentes para esses linfócitos tiveram sobrevida consideravelmente menor.

Concomitante ao demonstrado pelo estudo realizado por Zhang *et al.* (2003), outro trabalho mostrou que linfócitos T CD8+ intra-epiteliais nos tumores epiteliais de ovário, estavam correlacionados com melhora na sobrevida das pacientes, deixando claro que essas células estão associadas à resposta imune contra os tumores epiteliais de ovário. Nesse estudo os autores demonstraram através de análises imuno-histoquímicas que a presença de linfócitos Treg são fortes moduladores na supressão da resposta imune aos tumores, onde foi evidenciado que na presença dessas células há alteração nos efeitos anti-tumorais benéficos das células T CD8+ (SATO *et al.,* 2005).

Os linfócitos T CD8+ são responsáveis por induzir as células tumorais do câncer epitelial de ovário à apoptose pelo reconhecimento de antígenos tumorais apresentados por moléculas de MHC, podendo reconhecer proteínas com 8 a 10 aminoácidos. Esses linfócitos

são muito importantes na resposta imune frente aos tumores ovarianos, no entanto, por si só não são suficientes para a erradicação do câncer principalmente por serem imunologicamente influenciados pela ativação de linfócitos Treg (KNUTSON *et al.,* 2003).

As DCs são células muito importantes na apresentação de antígenos oriundos dos tecidos tumorais aos linfócitos T (COOSEMANS *et al.,* 2015). São encontradas no tecido periférico e podem entrar em contato com antígenos por diversos meios, incluindo endocitose de proteínas solúveis, fagocitose de exossomas derivados dos tumores, e absorção mediada por um receptor de corpos apoptóticos (KNUTSON *et al.,* 2003). São eficientes na absorção e processamento do antígeno, bem como na ativação de células T através das moléculas de MHC na superfície da célula (COOSEMANS *et al.,* 2015), contudo nos tumores em estádio avançado, o estroma tumoral pode alterar a expressão da molécula co-estimuladora de células T, tornando sua expressão muito baixa (KNUTSON *et al.,* 2003).

Após a exposição a estímulos pró-inflamatórios ou antigênicos, as DCs migram para os gânglios linfáticos de drenagem regional e durante essa migração sofrem maturação, adquirindo a capacidade de apresentar o antígeno às células T. Por sua vez, os linfócitos T antígeno-específicos são estimulados por contato direto com as DCs (KNUTSON *et al.,* 2003).

As funções das DCs são fortemente influenciadas pelo microambiente tumoral, onde citocinas produzidas por células tumorais ou mesmo por células imunitárias podem atuar em diversos níveis, incluindo a diferenciação em apresentadoras de antígenos específicos, tempo de vida, migração e apresentação de antígeno (LAVOUÉ *et al.,* 2013; COOSEMANS *et al.,* 2015).

Consequentemente, as suas propriedades imunológicas podem ser moduladas por estímulos ambientais e tumorais que podem beneficiar sua diferenciação reduzindo a imunidade adaptativa para antígenos tumorais, sendo descrito em estudos que, frequentemente essas células são alteradas no microambiente tumoral do câncer epitelial de ovário, onde há a

conversão das DCs para um fenótipo imunossupressor, além disso, a presença de grande número dessas células no estroma do câncer epitelial de ovário se associa a menor sobrevida livre da doença (LAVOUÉ *et al.*, 2013).

Outras células importantes na resposta imune aos tumores ovarianos são as células NK que além de terem propriedades de indução à morte celular podem apresentar antígenos. As células NK são linfócitos granulares grandes que não possuem os marcadores de superfície de IgG nem de células T. A atividade citolítica das células NK é inibida através da interação do receptor de células expressa KIR-NK com moléculas MHC de classe I. Essas células reconhecem tumores de uma forma não restrita ao MHC.

O papel das células NK na resposta imunológica pode ser a eliminação de células disfuncionais que perdem a expressão de MHC de classe I. Células NK, também desempenham um papel importante na resposta imunitária adaptativa por lise de patógenos revestidos com anticorpos ou células tumorais (MORETTA *et al.*, 2002). A análise imuno-histoquímica de tumores do ovário humano mostra que, embora a maior parte das células tumorais expresse MHC de classe I, uma pequena fração é negativa para essa molécula podendo ser alvo para as células NK (VAN NIEKERK *et al.*, 1993).

A MUC-16 (CA-125) protege as células tumorais do ovário do ataque do sistema imunológico, promovendo o crescimento do tumor. A presença dessa mucina viabiliza um método de fuga importante observado nos tumores ovarianos frente às células NK, onde há a ligação desse marcador com as células NK, principalmente células do subconjunto $CD16+/CD56^{dim}$, inibindo a sua função citolítica contra as células tumorais. A MUC-16 atua ainda como uma molécula anti adesiva, impedindo a sinapse das células do câncer do ovário com as células NK (BELISLE *et al.*, 2010).

As células NKT também são consideradas células efetoras importantes na resposta imune frente ao câncer epitelial de ovário. Expressam receptores de superfície celular típicos

para células NK e um receptor de linfócitos T semi-invariante (CD3+ CD56+) (SHI *et al.*, 2001). São ativadas através do reconhecimento de antígenos glicolipídicos em associação às moléculas CD1b (molécula MHC similar à presente nas células apresentadoras de antígenos).

As células NKT secretam predominantemente interleucina-4 (IL-4) e Interferon Gama (IFN-γ) importantes na regulação da secreção de citocinas com fenótipo Th1/Th2 durante uma resposta imune contra o câncer de ovário. O papel específico dos linfócitos NKT no microambiente do câncer ovariano ainda não foi bem esclarecido, contudo, a apresentação de glicolipídios alterados expressos através de moléculas CD1b em DCs pode aumentar ainda mais a resposta imune, ativando diretamente as células NKT (KNUTSON *et al.,* 2003). Com isso estratégias de imunoterapia poderiam ser projetadas futuramente visando a ativação das células imunes NKT efetoras (COOSEMANS *et al.*, 2015).

Outras células muito importantes na resposta imune aos tumores ovarianos são os macrófagos (HELAL *et al.,* 2004). Os macrófagos correspondem à uma das células guardiãs do sistema imune inato muito importantes onde suas funções incluem a cicatrização de feridas e resistência a infecções (BOOTCOV *et al.,* 1997), além de exercerem atividade anti-tumoral (BAERT *et al.*, 2015).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) geralmente são imunossupressores, mas podem ser divididos em dois grupos distintos M1 (imunoestimulante) e M2 (imunossupressor). O papel fisiológico de macrófagos M1 é a depuração de agentes patogênicos e a eliminação, por indução de apoptose, das células tumorais, utilizando sistemas onde há sinalizações de contato entre macrófagos com células T e NK ou pela secreção de citocinas levando à ativação do sistema imunitário adaptativo. Por outro lado, os macrófagos M2 têm uma baixa capacidade fagocítica e não estimula adequadamente as células NK e células T. Os macrófagos M2 podem ainda neutralizar a resposta imune através da produção

de moléculas imunossupressoras, conduzindo o câncer epitelial de ovário a mau prognóstico com o aumento do número de TAMs (KLIMP *et al.*, 2002; BAERT *et al.*, 2015).

A diferenciação de monócitos à macrófagos M1 é promovida por Interferon-γ, lipopolissacarídeo e outros produtos microbianos, levando a morte de bactérias, ativação de funções imunoestimulantes e citotoxicidade anti-tumor (SICA *et al.*, 2008). Geralmente no microambiente tumoral nota-se mudanças no fenótipo dos TAMs, ou seja, onde há perfil celular M1 passará a ser M2 (BAERT *et al.*, 2015). Os principais fatores que causam a mudança nesse perfil no microambiente tumoral são hipoxia, fator estimulante de colônias de macrófagos, TGF-β, IL-4, IL-13 e a presença de apoptose (NOY & POLLARD, 2014). A alteração dessas células pode favorecer a migração das células tumorais e de metástases através da interação principalmente com moléculas biologicamente ativas que permitem o crescimento tumoral como IL-4, IL-10 e IL-13 (KLIMP *et al.*, 2002).

Um estudo observou que os TAMs estavam presentes em todos os tumores ovarianos, tanto benignos quanto malignos, sendo que, dentro das populações celulares dos tumores malignos foram encontrados uma média maior de TAMs 51.2% contra os 32,9% encontrados nos tumores benignos por eles avaliados. Ainda segundo os pesquisadores os TAMs juntamente com linfócitos T CD8+ são as células imunes mais abundantemente encontradas nas neoplasias ovarianas, deixando evidente a importância dessas células do sistema imune na resposta frente ao câncer ovariano (HELAL *et al.*, 2004).

A presença do marcador tumoral GDF-15 no microambiente tumoral pode inibir a secreção do TNF-α por macrófagos ativados (BOOTCOV *et al.*, 1997), causando como consequencia a diminuição da destruição das células tumorais (KARAN *et al.*, 2009).

As concentrações séricas do marcador tumoral GDF-15 juntamente com sua marcação imuno-histoquímica no epitélio e no estroma do câncer epitelial de ovário serão abordados nesse trabalho.

2. HIPÓTESE

Pacientes com neoplasia maligna de ovário apresentam valores mais elevados de GDF-15 sérico e imunomarcação tecidual de GDF-15 mais intensa comparando-se com pacientes com neoplasia benigna de ovário.

3. OBJETIVOS

1. Investigar a expressão de GDF-15 nos compartimentos estromal peri-tumoral e epitelial nas neoplasias benignas e malignas epiteliais ovário.

2. Avaliar o marcador tumoral GDF-15, quantificando seus níveis séricos em neoplasias epiteliais benignas e malignas primárias de ovário.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo apresentam-se os materiais utilizados e os métodos realizados no desenvolvimento desse estudo. Listam-se abaixo os materiais e consecutivamente os métodos nos itens seguintes.

4.1 PACIENTES

Foram analisadas 204 pacientes atendidas, no período de 1997 a 2013, no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM. Dessas 204 pacientes, foram selecionadas 65, as quais estavam enquadradas dentro dos critérios de inclusão do trabalho. Essas 65 pacientes representam o "n" desse estudo.

4.1.1 Critérios de indicação de laparotomia exploradora

Os critérios de indicação de laparotomia exploradora foram: cistos anecóicos com diâmetro máximo menor que 7cm e com persistência da alteração por mais que 6 meses e marcadores tumorais normais; marcadores tumorais alterados; cistos anecóicos com diâmetro máximo maior ou igual a 7cm; massas ovarianas com conteúdo sólido, presença de vegetação intracística, septos grossos, 2 ou mais septos finos; *color Doppler* com índice de resistência menor ou igual a 0,4 (MURTA *et al.*, 2004; MURTA & NOMELINI, 2006).

4.1.2 Caracterização dos grupos

As pacientes foram divididas em dois grupos, de acordo com o diagnóstico anatomopatológico, desta forma: o primeiro grupo de neoplasias ovarianas epiteliais benignas (n=31), e o segundo grupo de neoplasias ovarianas epiteliais malignas primárias (n=34). Os casos *borderline* foram incluídos no grupo de neoplasias malignas.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, sob protocolo número: 2061/2011 (Anexo A). Consentimento livre e esclarecido por escrito foi obtido de cada paciente ou de seus familiares (Anexo B).

4.1.3 Critérios de inclusão

O critério de inclusão foi diagnóstico pós-operatório de neoplasia epitelial primária de ovário (benigna ou maligna) pela análise anátomo-patológica em parafina.

4.1.4 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: neoplasia maligna secundária de ovário (metástase); tumor primário de ovário de linhagem não epitelial; tratamento prévio à cirurgia (Quimioterapia).

4.2 MÉTODOS

Listam-se abaixo o modelo de estudo, os métodos, a realização da análise anátomo-patológica, os protocolos adotados para as análises imuno-histoquímica e imuno-enzimática, bem como o banco de dados, a realização da análise estatística e a redação do texto.

4.2.1 Análise anátomo-patológica

Foi realizada análise anátomo-patológica dos cortes embebidos em parafina pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, sendo que os casos foram revisados por um observador da Disciplina de Patologia Especial da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde e Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - FIGO.

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

4.2.2 Análise imuno-histoquímica

Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica foram processados em parafina. Os casos que preencheram os critérios após o estudo pela técnica de hematoxilina-eosina foram revisados por patologista experiente e os blocos dos casos escolhidos foram submetidos a

novos cortes com 4µm de espessura, em lâminas silanizadas (*APTS - Silano, Sigma® A3648*), empregando-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase.

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

Posteriormente, as lâminas permaneceram em um banho de solução salina tamponada, o PBS (pH 7,2), durante 5 minutos, para hidratação. Logo depois, o excesso de tampão foi removido e a borda do corte seca, cuidadosamente, com papel absorvente.

A seguir, foi realizada a recuperação dos antígenos. As lâminas foram colocadas em tubos de citologia contendo solução tampão Citrato 10mM (pH 6,0) ou Tris-EDTA, conforme orientação do fabricante, e colocados dentro de uma panela Pascal, que foi completada com água destilada até o limite indicado durante 30 minutos a uma temperatura de 100°C. Então, os tubos foram retirados de dentro da panela e colocados sobre a bancada para seu resfriamento.

As lâminas foram colocadas em uma prancha de incubação e lavadas com água destilada e enxugadas, cuidadosamente, em torno do corte, não permitindo que os cortes ficassem completamente secos. Foi adicionada água oxigenada a 3% sobre cada corte, durante 10 minutos, para ocorrer o bloqueio da peroxidase endógena. Após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas em 3 banhos de tampão PBS e incubadas com o anticorpo primário em torno de 18 horas, em câmara úmida, com temperatura de 3 a 4ºC.

O anticorpo foi diluído em soro de albumina bovina (*Sigma®*) de acordo com as indicações presentes em suas especificações. Essas preparações de albumina bovina (BSA a 2%) e anticorpo primário permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir coloração de fundo.

Após a incubação em *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico (IgG anti-GDF-15 policlonal de coelho, *Santa Cruz Biotechnology®, Inc.* com diluição 1:200), as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente, em torno de 15 minutos, lavadas em PBS e secas, como anteriormente. O anticorpo secundário biotinilado (*Dako Cytomation® LSAB and System-HRP*) foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos, em temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, ocorreram lavagens em PBS, e as lâminas foram secas. O complexo estreptavidina peroxidase (*Dako Cytomation® LSAB and System-HRP*) foi adicionado por 30 minutos nas mesmas condições acima.

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

Finalmente, as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10 segundos cada, para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol, por 5 minutos cada. Lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com bálsamo do Canadá (*entellan®*) para posterior análise.

Foi utilizado como controle positivo tecido placentário humano. Dois observadores avaliaram as lâminas. A intensidade de marcação foi avaliada subjetivamente no epitélio e no estroma utilizando-se uma escala de 0 a 3: 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação forte) (ÖZEL *et al.,* 2006). A marcação foi avaliada no epitélio e no estroma peritumoral.

As intensidades de marcação imuno-histoquímica 0 e 1 (Figuras 1 e 2, respectivamente) foram consideradas como marcação de fraca intensidade, e 2 e 3 (figuras 3 e 4, respectivamente) como marcação de forte intensidade.

Figura 1 - Intensidade 0 (zero) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15

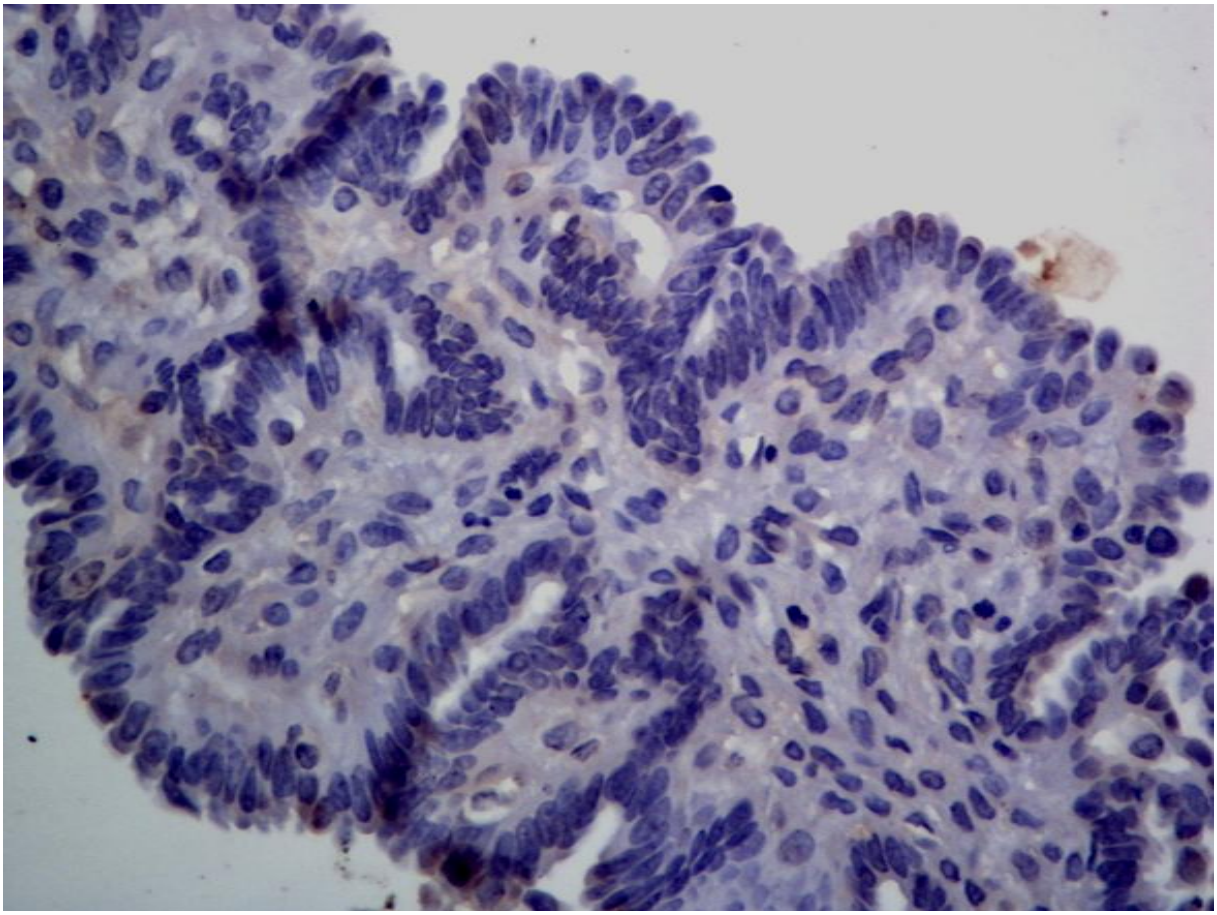


Fig. 1 - Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15 evidenciando intensidade de coloração 0 (zero) no estroma e epitélio em corte histológico de neoplasia maligna ovariana (400x). Fonte: O autor.

Figura 2 - Intensidade 1 (um) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15

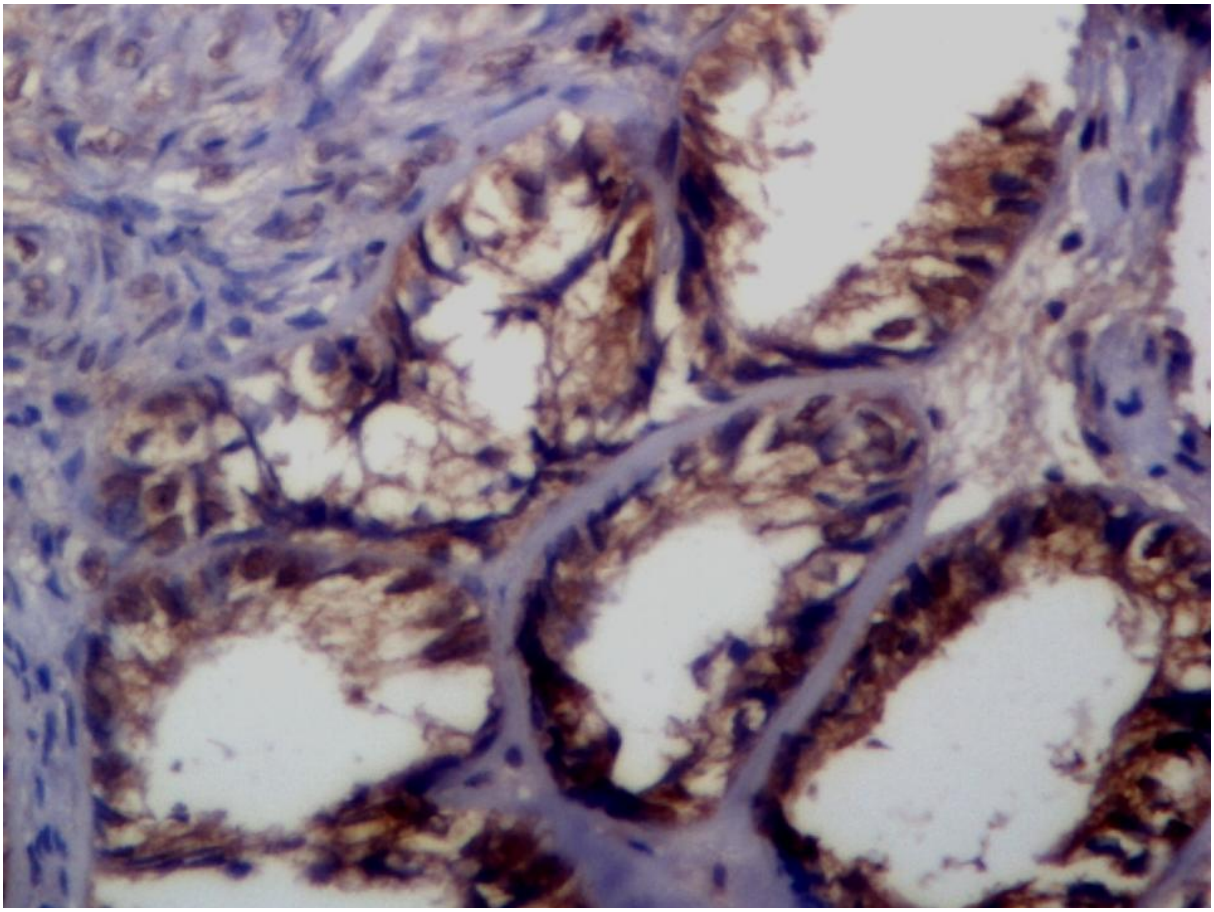


Fig. 2 - Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15 evidenciando intensidade de coloração 1 (um) no estroma e 3 (três) no epitélio em corte histológico de neoplasia maligna ovariana (400x). Fonte: O autor.

Figura 3 - Intensidade 2 (dois) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15

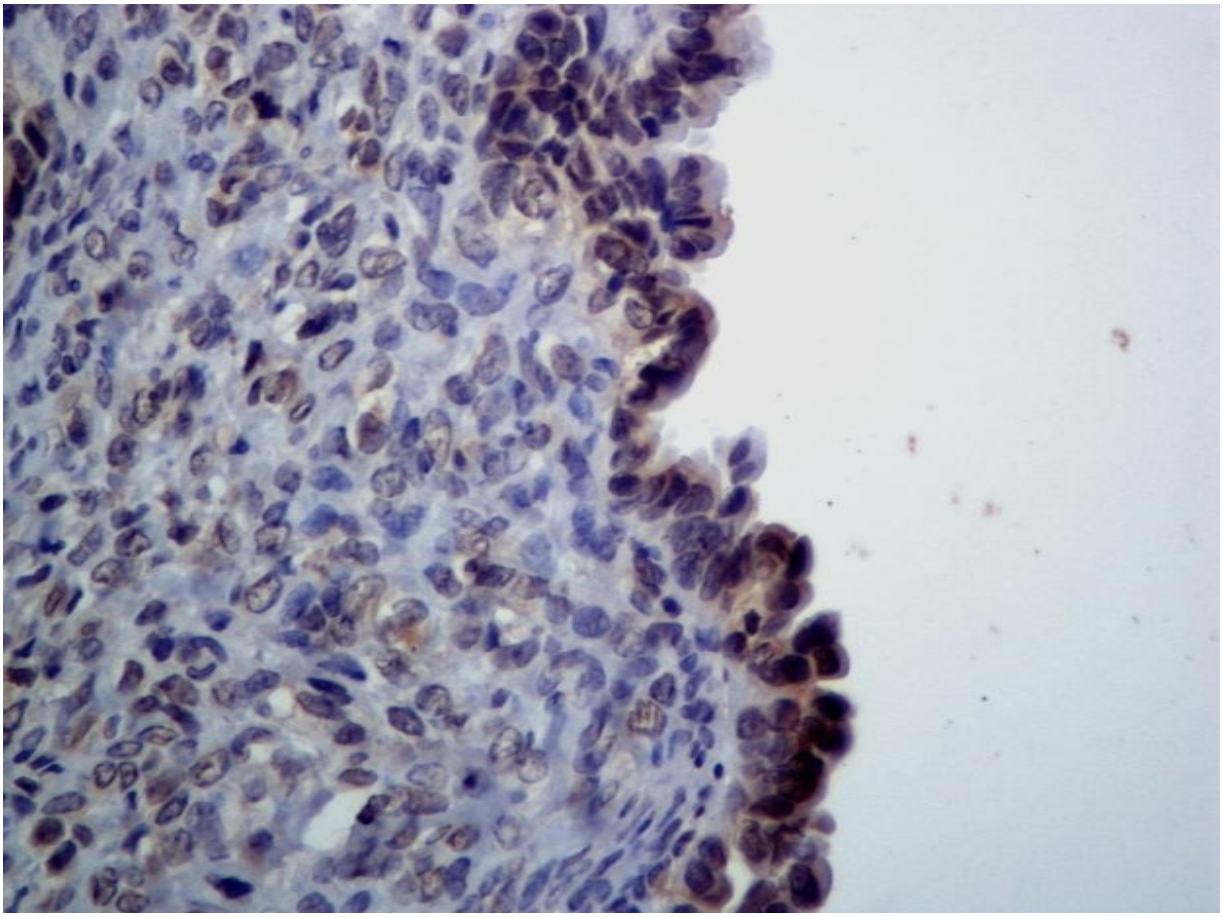


Fig. 3 - Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15 evidenciando intensidade de coloração 2 (dois) no estroma e 3 (três) no epitélio em corte histológico de neoplasia maligna ovariana (400x). Fonte: O autor.

Figura 4 - Intensidade 3 (três) de marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15

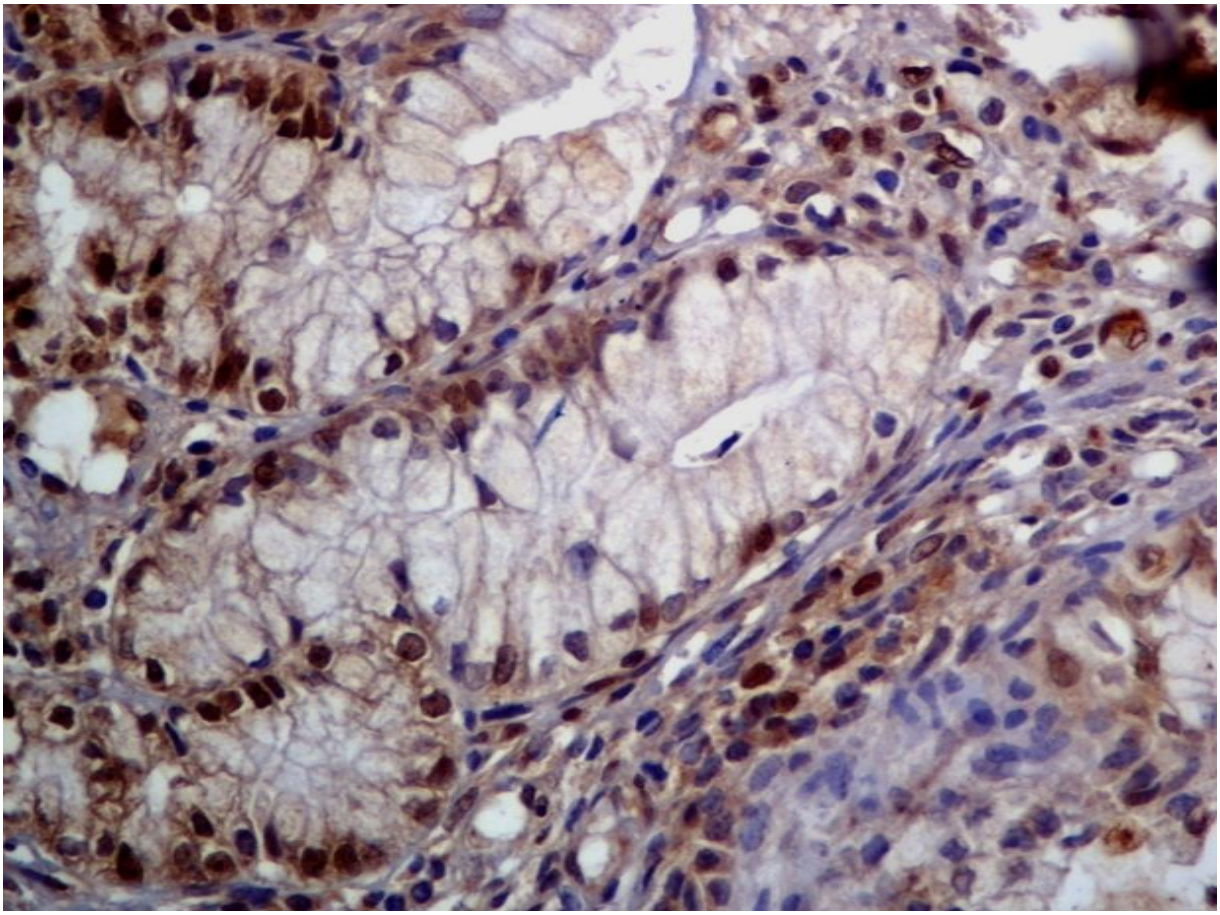


Fig. 4 - Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-GDF-15 evidenciando intensidade de coloração 3 (três) no estroma e epitélio em corte histológico de neoplasia maligna ovariana (400x). Fonte: O autor.

4.2.3 Análise imuno-enzimática

Amostras de sangue venoso foram coletadas através do sistema à vácuo em tubos com gel separador (*BD Vacutainer*®). Após 30 minutos de coagulação as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4ºC por 10 minutos à 2000rpm, onde o soro foi armazenado em alíquotas de 250µL à -80ºC até sua utilização. As amostras foram descongeladas uma vez imediatamente antes da análise.

Os níveis séricos de GDF-15 foram medidos utilizando o kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) imuno-enzimático tipo sanduíche (*Aviscera Bioscience® Inc.*) onde todos os reagentes foram preparados conforme protocolo do fabricante.

Para a realização do teste, em resumo, foram adicionados aos poços da placa de ELISA, revestida com anticorpo monoclonal contra GDF-15 IgG humana, 100µL de tampão de diluição, padrões diluídos, amostras e controle positivo correspondendo respectivamente aos poços branco, curva, amostras e controle positivo.

A placa de ELISA foi coberta por selante adesivo e incubada 2h. em temperatura ambiente em micro agitador de placas. Em seguida foi realizada aspiração e lavagem dos poços 3 vezes com 300µL de tampão de lavagem utilizando-se pipetas multi-canal automáticas.

Foi retirado totalmente o excesso de líquidos dos poços adicionando-se em seguida 100µL do anticorpo de detecção biotinilado contra GDF-15 IgG humana onde uma segunda incubação foi realizada por 2h. em temperatura ambiente em micro agitador de placas.

Foi repetida a aspiração e lavagem como descrito acima e após foi adicionado 100µL do conjugado de estreptavidina com peroxidase (HRP) e uma terceira incubação foi realizada por 1h. em temperatura ambiente em micro agitador de placas completamente protegida da luz.

Foram realizadas as lavagens e em seguida foi adicionado 100µL em cada poço da solução substrato de tetrametilbenzidina (TMB) incubando a placa por 5min. em temperatura ambiente completamente protegida da luz.

Após a incubação foram adicionados em cada poço 100µL da solução de parada (0,5M de HCl). Finalmente, a densidade óptica de cada poço foi determinada utilizando um leitor de microplacas fixado para 450nm.

O teste possui um limite de detecção de 1pg/mL, precisão inter-ensaio de 8-10% e precisão intra-ensaio de 4-6%.

4.2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *GraphPad Instat software*. A concordância entre dois observadores do estudo imuno-histoquímico foi realizado através do *kappa*: $\kappa < 0,4$: concordância fraca; $0,4 \leq \kappa < 0,8$: concordância moderada; $0,8 \leq \kappa < 1,0$: concordância forte; $\kappa = 1,0$: concordância perfeita (ARANGO, 2001).

Houve concordância perfeita na avaliação do epitélio e concordância forte na avaliação do estroma tumoral. Todos os casos discordantes foram reavaliados e o resultado foi definido por consenso.

Teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os resultados obtidos por imuno-histoquímica para GDF-15. Dados dos níveis séricos de GDF-15 foram expressos por média e desvio-padrão, e os valores foram comparados pelo teste t de *"student"* não pareado. Foram considerados significativos os valores de *p* menor que 0,05.

4.2.5 Redação do texto

O texto desse trabalho foi redigido conforme as normas técnicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

5. RESULTADOS

As 65 mulheres atendidas foram divididas em dois grandes grupos, sendo o de neoplasias benignas composto por 31 pacientes, e o grupo de neoplasias malignas composto de 34 pacientes. A mediana de idade das pacientes foi de 47 anos (18-69 anos) no grupo benigno e 50 (25-79 anos) no grupo maligno. A paridade mediana foi de 2 (0-7 partos) em ambos os grupos. Das 65 pacientes, 34 (52,3%) estavam no menacme e 31 (47,7%) pacientes estavam na menopausa. 6 (17.6%) pacientes do grupo maligno foram a óbito (tabela 1).

Tabela 1 - Características dos dois grupos de pacientes comparados no estudo.

	Neoplasias benignas n=31(%)		Neoplasias malignas n=34 (%)	
Idade (mediana em anos)	47	--	50	--
Paridade (mediana)	2	--	2	--
Status hormonal: Menacme	20	(64.5)	14	(41.2)
Status hormonal: Menopausa	11	(35.5)	20	(58.8)
Óbito	--	(0)	6	(17.6)

Fonte: O autor

Os subtipos histológicos do grupo de neoplasias benignas estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia benigna

	Neoplasias benignas (n=31)	
	n	%
Cistoadenoma mucinoso	11	35.5
Cistoadenoma mucinoso + tumor de Brenner	1	3.2
Cistoadenoma seroso	17	54.8
Cistoadenoma seromucinoso + tumor de Brenner	1	3.2
Cistoadenoma seroso papilífero + tumor de Brenner	1	3.2

Fonte: O autor

Os subtipos histológicos do grupo de Neoplasias Malignas estão descritos na tabela 3.

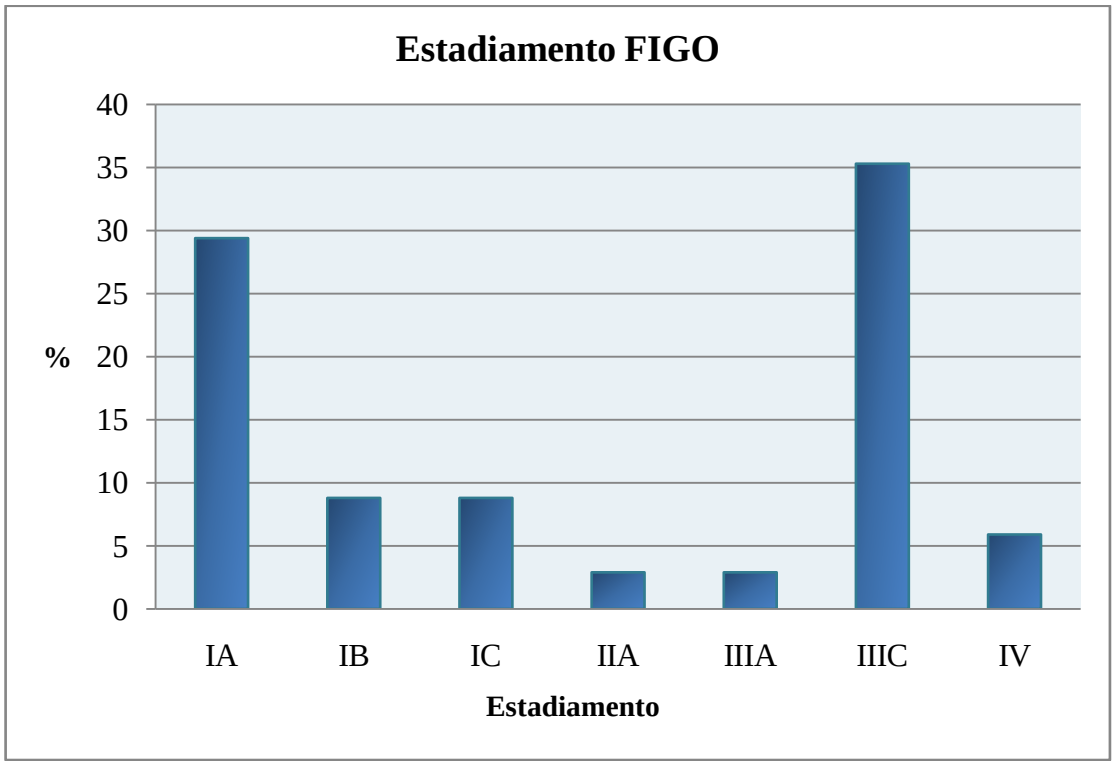
Tabela 3 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia maligna

	Neoplasias Malignas (n=34)	
	n	%
Adenocarcinoma anaplásico papilífero	1	2.9
Adenocarcinoma de grandes células	1	2.9
Adenocarcinoma endometrióide	1	2.9
Adenocarcinoma pouco diferenciado grau III	1	2.9
Adenocarcinoma seroso	2	5.9
Carcinoma de células claras	2	5.9
Cistoadenocarcinoma mucinoso	2	5.9
Cistoadenocarcinoma mucinoso *borderline*	9	26.5
Cistoadenocarcinoma seroso	11	32.4
Tumor endometrioide proliferativo atípico *borderline*	1	2.9
Tumor seroso *borderline*	3	8.8

Fonte: O autor

O estadiamento das neoplasias malignas segundo a FIGO foram: IA n = 10 (29.4%), IB n = 3 (8.8%), IC n = 3 (8.8%), IIA n = 1 (2.9%), IIIA n = 1 (2.9%), IIIB n = 2 (5.9%), IIIC n = 12 (35.3%) e IV n = 2 (5.9%) (Figura 5).

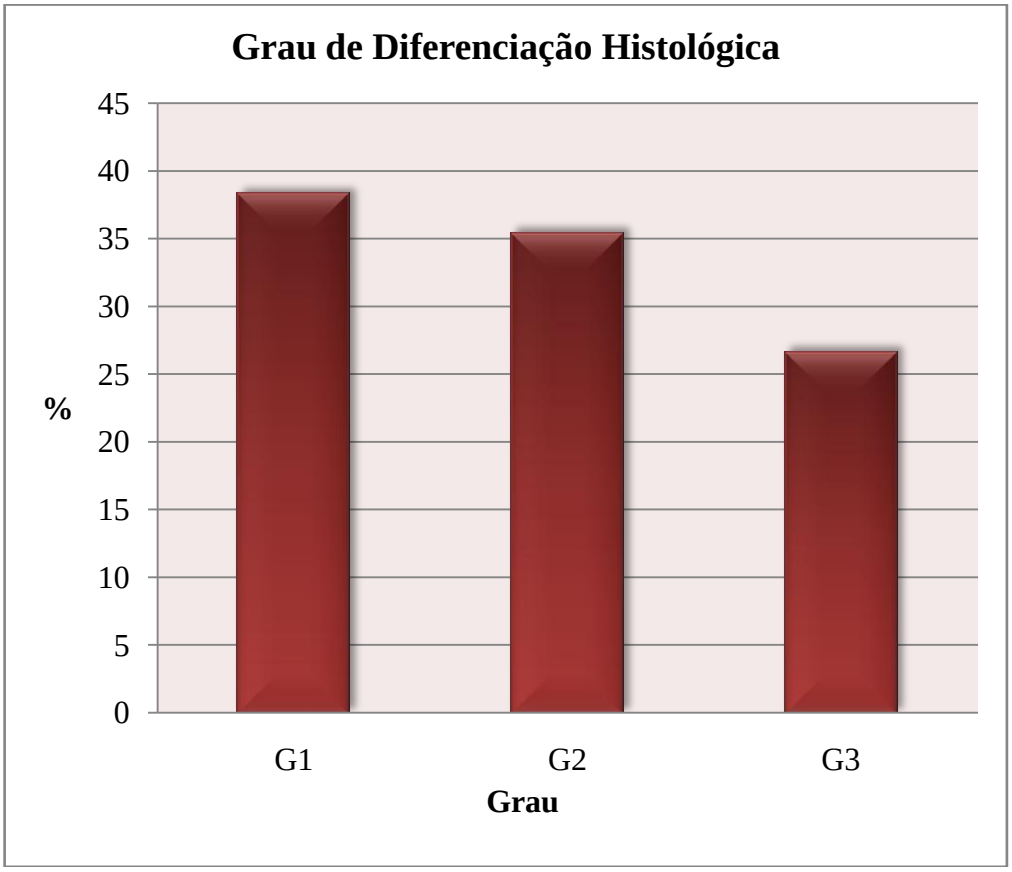
Figura 5 - Frequência (%) dos tipos de estadiamento para câncer ovariano segundo os critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna



Fonte: O autor

O grau de diferenciação histológica das neoplasias malignas foram: Grau 1 n=13 (38.2%), grau 2 n=12 (35.3%) e grau 3 n=9 (26.5%) (figura 6).

Figura 6 - Grau de diferenciação histológica das neoplasias malignas



Fonte: O Autor

5.1 MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE GDF-15

Houve amostras suficientes para o estudo imuno-histoquímico de 31 neoplasias benignas de ovário e 28 neoplasias malignas de ovário.

Os resultados da marcação imuno-histoquímica estão demonstrados na tabela 4. Imunomarcação ≤ 1 foi considerada fraca intensidade e imunomarcação ≥ 2 foi considerada forte intensidade. Marcação 2 ou 3 de GDF-15 foi significativamente mais frequente no estroma de câncer de ovário comparado com neoplasias benignas (p=0,0034). Não houve diferença significativa na avaliação do epitélio (p=0,1331).

Tabela 4 - GDF-15 Marcação Imuno-histoquímica no epitélio e estroma das neoplasias de ovário benignas e malignas.

	GDF-15 coloração 0/1 n (%)	GDF-15 coloração 2/3 n (%)
Neoplasias benígnas/epitélio (n=31)	10 (32.3%)	21 (67.7%)
Neoplasias malignas/epitélio (n=28)	4 (14.3%)	24 (85.7%)
Neoplasias benígnas/estroma (n=31)	19 (61.3%)	12 (38.7%)
Neoplasias malignas/estroma* (n=28)	6 (21.4%)	22 (78.6%)

*Teste exato de Fisher *p*=0.0034 comparado com neoplasias benignas/estroma. Fonte: O Autor.

5.2 NÍVEIS SÉRICOS DE GDF-15

Amostras do soro das pacientes foram testadas para dosagem de GDF-15 a fim de estudar a produção sistêmica desse marcador tumoral. A média dos níveis de GDF-15 foi maior em neoplasias malignas (416,52pg/mL ± 186,6; n=17) comparada com neoplasias benignas (371.76pg/mL ± 176.05; n=21), mas sem significância estatística (p=0,45).

6. DISCUSSÃO

O câncer epitelial de ovário ainda é uma doença desafiadora, levando milhares de mulheres a óbito anualmente, devido à dificuldade do seu diagnóstico e tratamento (FEHM *et al.,* 2010). É um dos tumores com a menor taxa de sobrevivência entre as neoplasias ginecológicas, por ser diagnosticado em estádios avançados (ALQASEMI *et al.,* 2012). Nos Estados Unidos da América, cerca de 14.180 mortes são estimadas para o ano de 2015 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A ultrassonografia pélvica transvaginal tem sido promissora, principalmente após a adoção de padronizações de protocolos internacionais, que auxiliam na detecção precoce de massas anexiais não-fisiológicas que pré dispõe mulheres ao câncer (NUNES *et. al.,* 2014). De acordo com dados da literatura a ampliação do uso padronizado do ultrassom associado ao *Color Doppler* favorece muito o diagnóstico do câncer epitelial de ovário maligno, sendo a utilização dos exames de imagem em conjunto com a dosagem dos marcadores tumorais imprescindíveis na abordagem e no tratamento das pacientes (VAN CALSTER *et al.,* 2014).

Os marcadores tumorais podem ser muito úteis no manejo das neoplasias ovarianas, visto que apresentam seus níveis séricos elevados no decorrer da doença e a normalização desses níveis está ligado à remissão da doença (REIS, 2005).

A mediana de idade das nossas pacientes foi de 47 anos para o grupo de neoplasias benignas e 50 anos para o grupo de neoplasias malignas, a paridade mediana para ambos os grupos foi de 2 partos. Valores similares foram encontrados na literatura (STAFF *et al.,* 2010). A maioria de nossas pacientes estavam no menacme, porém não correlacionamos valores de GDF-15 com esse status hormonal como descrito por Staff *et al.* 2010, que evidenciaram concentrações maiores do marcador em pacientes na menopausa. Verificamos que o estadiamento dos tumores malignos em nosso estudo com maior prevalência foi o estadiamento I, dados que não se correlacionaram com os valores encontrados por Staff *et al.* 2010, onde a maioria das pacientes para esse grupo estavam em estádio III.

Nosso estudo avaliou as concentrações séricas do marcador tumoral GDF-15 e sua marcação tecidual por imuno-histoquímica no tecido tumoral do ovário, verificando-se a sua presença ou ausência, associados à intensidade de coloração no epitélio e estroma tumorais.

A demonstração de GDF-15 como marcador de atividade tumoral no câncer de ovário é recente, e ainda existem poucos artigos na literatura que descrevem em detalhes a interação desse marcador em relação aos tumores ovarianos (BOCK *et al.*, 2010; STAFF *et al.*, 2010; GRINER *et al.*, 2013). Porém, a atividade do GDF-15 no adenocarcinoma de pâncreas, no carcinoma da próstata, de mama e colorretal têm sido com maior frequencia relatados (WELSH *et al.*, 2003; KOOPMANN *et al.*, 2006).

Staff *et al.* (2011) avaliaram 510 pacientes com neoplasias endometriais, onde constataram uma correlação direta do marcador com a sobrevida das pacientes. Foi possível observar que mulheres com níveis plasmáticos aumentados de GDF-15 obtiveram sobrevida em 5 anos livre da doença em 70% dos casos em comparação com 89% das pacientes com níveis mais baixos. A sobrevida livre de recidiva foi de 62% nas pacientes com níveis plasmáticos elevados contra 84% daquelas com níveis menores, portanto houve queda significativa do tempo de sobrevida livre da doença e menor espaço de tempo para recorrência. Observaram que mulheres com altos níveis de GDF-15 possuíam risco maior de metástases linfonodais em comparação com pacientes com baixos níveis do marcador. As maiores concentrações de GDF-15 estavam associadas com estadiamento III e IV da FIGO, tendo correlações com metástases em linfonodos e baixa sobrevida no câncer endometrial.

Encontramos valores séricos elevados de GDF-15 tanto em neoplasias malignas quanto em neoplasias benignas, no entanto, o grupo *borderline* foi inserido no grupo de malignos, mesmo tendo um prognóstico reservado, e não correlacionamos nossos resultados com o estadiamento da FIGO, contudo, um estudo realizado recentemente evidenciou que a

mediana dos níveis séricos de GDF-15 aumentou conforme o estadiamento da FIGO no câncer de ovário (STAFF *et al.,* 2010).

As concentrações séricas elevadas de GDF-15 encontradas em nosso estudo podem ser justificadas pela atuação do sistema imunológico contra a presença das células tumorais. É sabido que o sistema imune atua diretamente nos tecidos neoplásicos (BAERT *et al.,* 2015). A elevação da concentração sérica desse marcador poderia levar à diminuição da resposta imune ao tecido tumoral, principalmente em estádios avançados da doença pela interação direta com macrófagos ativados (BOOTCOV *et al.,* 1997).

Uma teoria que reforça a imunomodulação foi descrita na literatura (ZHANG *et al.,* 2003). Um estudo observou que o GDF-15 inibia a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados por lipopolissacarídeos bacterianos, suprimindo a formação de macrófagos-granulócitos em mulheres gestantes. Com esse estudo, foi possível observar que o estado inflamatório intra-uterino estava associado a rejeição fetal e a trabalho de parto pré-termo. Os dados mostravam que a avaliação placentária apresentava concentrações extremamente baixas do marcador. Acredita-se que o GDF-15, presente na placenta e no líquido amniótico atuam na manutenção da gravidez por suprimir a produção de citocinas que levam à inflamação (MOORE *et al.,* 2000).

No estudo de Staff *et al.* (2010), foi possível verificar a presença da marcação imuno-histoquímica de macrófagos no ambiente peritumoral dos tumores ovarianos malignos e *borderline*, o que deixa evidente que há interação dessas células com GDF-15 e reposta imune aos tumores. Segundo os autores, uma elevação dos níveis circulantes do marcador pode representar o efeito de uma resposta inflamatória intensificada nas pacientes desse grupo em comparação às pacientes com tumores benignos e saudáveis.

A resposta imunológica e a ocorrência de neoplasias tem sido amplamente documentada (KNUTSON *et al.,* 2003; ZHANG *et al.,* 2003; BAERT *et al.,* 2015;

COOSEMANS *et al.,* 2015). O sistema imune possui propriedades distintas no câncer epitelial de ovário, onde há atuação de células efetoras e imunomoduladoras (BAERT *et al.,* 2015). O microambiente tumoral limita a atuação das células que combatem a proliferação e deslocamento das células neoplásicas a outros tecidos e favorece a diferenciação de células que regulam o sistema imune para um perfil imunossupressor, ocasionando o aumento das massas tumorais bem como a migração das células tumorais à tecido adjacentes, ocasionando a progressão da doença e elevando seu risco de malignização, principalmente em pacientes em estádios mais avançados do câncer (BAERT *et al.,* 2015).

Entre as células que atuam diretamente no microambiente tumoral se destacam os TAMs que infiltram no estroma dos tumores epiteliais de ovário e por interação com moléculas biologicamente ativas produzidas pelo tumor acabam se transformando em células imunossupressoras importantes na interação tumor-hospedeiro, sendo essa interação o que deixa evidente a relação das células imunes frente aos tumores no câncer epitelial de ovário (BAERT *et al.,* 2015). Mesmo com dados já publicados na literatura, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de se definir especificamente o papel que cada célula do sistema imune exerce no microambiente tumoral.

A expressão aumentada de GDF-15 no tecido é frequentemente associada com níveis séricos elevados. Uma concentração sérica que circunda valores de 200-1200 pg/mL pode ser considerada elevada e esses valores podem apoiar a teoria de que esse marcador pode ser potencialmente útil para o diagnóstico e/ou monitorização de diversos tipos de câncer (BAUSKIN *et al.,* 2006). Em nosso trabalho encontramos valores de GDF-15 mais elevados em neoplasias malignas epiteliais primárias de ovário em comparação com neoplasias benignas, no entanto, não houve significância estatística entre nossas dosagens. Brown *et al.* (2003) demonstraram em seu trabalho que a elevação dos níveis séricos de GDF-15 no câncer de cólon estavam intimamente associados com a progressão da doença alterando o seu perfil

de normal para adenoma, carcinoma e doença metastática. Ainda segundo os autores, no câncer de cólon, os níveis de GDF-15 no soro refletiam o estádio e extensão do tumor, e a sua dosagem diagnóstica é um preditor independente de metástases e sobrevida global (BROWN *et al.*, 2003).

Resultados semelhantes foram encontrados por Wang *et al.* (2014), que demonstraram um aumento significativo dos níveis séricos de GDF-15 em pacientes com carcinoma epidermoide do esôfago comparados a pacientes saudáveis; pacientes com maiores concentrações de GDF-15 no soro tiveram pior prognóstico de sobrevida livre de recidiva. Além disso, os níveis elevados do marcador apresentaram associação positiva com invasão tumoral e metástases em linfonodos. Os autores demonstraram ainda que a sensibilidade desse marcador tumoral foi significativamente melhor nesses pacientes do que os demais marcadores utilizados para auxílio do diagnóstico clínico em pacientes em estádios iniciais do câncer.

Quase todos os nossos tecidos avaliados por imuno-histoquímica continham expressão de GDF-15 tanto no estroma como no epitélio. Nossas amostras apresentaram diferentes tipos de classificações histológicas, porém concentramos nossa análise nos tumores epiteliais de ovário. No estroma, observamos pouca ou fraca marcação para GDF-15, contudo o epitélio das amostras analisadas apresentou uma marcação abundante.

O subtipo histológico mais encontrado em nossas amostras foi de tumores serosos, reforçando dados na literatura da prevalência desse subtipo histológico (TRUDEL *et al.*, 2012). Há correlação de nossos dados com o trabalho de Staff *et al.* (2010) onde os pesquisadores encontraram expressão aumentada de GDF-15 somente no epitélio dos tumores ovarianos serosos, já no estroma, em divergência ao nosso trabalho, os pesquisadores não encontraram nenhuma expressão tecidual do marcador. Como relatado pelos autores,

provavelmente a ausência da expressão no estroma de GDF-15 se deu ao fato da limitação na quantidade e classificação histológica de suas amostras.

No estudo realizado por Griner *et al.* (2013) GDF-15 estava presente em cerca de 80% de todos os tumores ovarianos e em cerca de 96% dos tumores serosos avaliados por imuno-histoquímica. No nosso estudo, a presença desse marcador em todas as amostras avaliadas, pode estar relacionada ao número menor de pacientes avaliadas, bem como ao fato de nossa abordagem ser apenas dos tumores epiteliais ovarianos. Bock *et al.* (2010), relataram que 97% dos carcinomas do ovário apresentaram coloração citoplasmática para GDF-15. Nesse mesmo estudo, a forte marcação imuno-histoquímica de GDF-15 estava correlacionada com a redução da sobrevida global.

Nos estádios avançados do câncer ovariano, o GDF-15 pode capacitar as células cancerosas a promoverem quimiorresistência, proliferação, migração e invasão, além de metástases em tecidos distantes (MIMEAULT & BATRA, 2010). Nosso estudo não avaliou essas ocorrências, no entanto, o trabalho de Griner *et al.* (2013) deixou clara essas afirmações quando os autores pesquisaram, através da cultura de células sob adição exógena de GDF-15, o efeito que o marcador realizava sobre as células. Os autores puderam identificar que houve estimulação do crescimento independente de ancoragem de células do câncer do ovário, aumento da capacidade invasiva dessas células, bem como a migração e a proliferação celular.

O microambiente tumoral desempenha um papel importante no comportamento da neoplasia. O estroma pode controlar o crescimento tumoral e a invasão. Este compartimento tem uma grande importância e influencia a resposta imunológica. A infiltração de células imunes em tumores pode ainda determinar a evolução e prognóstico da doença e a interação entre as células cancerosas e o estroma é crítico para o crescimento de tumores (AKAHANE *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que Fibroblastos Associados ao Câncer (CAFs) podem promover diretamente a tumorigênese através de múltiplos mecanismos, incluindo angiogênese, proliferação, invasão e imunossupressão (ÖSTMAN & AUGSTEN, 2009; FRANCO *et al.,* 2012). Estes efeitos são mediados através da expressão e secreção de vários fatores de crescimento como o TGF-β, VEGF e IL-8 (BRENNEN *et al.,* 2012). Bruzzese *et al.* 2014 demonstraram um papel importante para a regulação positiva do GDF-15 (MIC-1) membro da família TGF-β/BMP no estroma do tumor. GDF-15 foi encontrado aumentado *in situ* e em culturas primárias de CAFs no câncer de próstata. Fibroblastos expressando GDF-15 exerceram efeitos sistêmicos sobre o crescimento de células cancerosas da próstata *in vivo*.

Existem poucos estudos na literatura que avaliaram a marcação tecidual de GDF-15 no câncer de ovário. E há apenas um estudo que cita a marcação imuno-histoquímica em tumores ovarianos (Staff *et al.*, 2010).

Assim, nosso estudo demonstra a importância do estroma como regente da carcinogênese e progressão tumoral, e esse achado interessante no estroma pode ser um alvo para futuras pesquisas sobre o papel desse marcador tumoral no estroma em neoplasias ovarianas.

O marcador tumoral GDF-15, como todos os outros marcadores tumorais já utilizados na prática clínica, possui limitações, dentre as quais se destaca o fato de o marcador ser expresso em macrófagos, podendo estar elevado nas dosagens séricas de pacientes com doenças associadas com a ativação dessas células como, por exemplo, pancreatite, diabetes e icterícia (KOOPMANN *et al.,* 2006).

O GDF-15 vem surgindo no grupo dos marcadores tumorais como uma ferramenta importante no auxílio diagnóstico do câncer epitelial do ovário, onde seus níveis séricos apresentam maior sensibilidade de detecção em relação aos demais marcadores, uma vez que está aumentado tanto em neoplasias benignas bem como malignas, sendo sua detecção

precoce favorável no manejo, e consequentemente no tratamento das pacientes com neoplasias benignas e/ou malignas epiteliais de ovário.

Contudo, as descobertas atuais descritas na literatura ainda possuem limitações, sugerindo que, mais estudos prospectivos devem ser realizados para melhor fornecer dados sobre o funcionamento e interação de GDF-15 com o organismo das portadoras do câncer epitelial de ovário, bem como, elucidar o papel das células imunes participantes na interação tumor-hospedeiro no estroma das portadoras de neoplasias de ovário norteando seus efeitos nos tecidos tumorais.

7. CONCLUSÕES

A marcação imuno-histoquímica de GDF-15 é elevada no estroma de neoplasias malignas epiteliais primárias de ovário em comparação com neoplasias benignas.

As concentrações séricas de GDF-15 são mais elevadas nas portadoras de neoplasias malignas epiteliais primárias de ovário quando comparadas com neoplasias benignas, porém, sem significância estatística.

REFERÊNCIAS

ABIKO, K.; MANDAI, M.; HAMANISHI, J. et al. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. **American Journal of Surgical Pathology**. v.34, n.12, p.1842-1848, 2010.

AGARWAL, R.; KAYE, S.B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. **Nature reviews. Cancer**. v.3, n.7, p.502-516, 2003.

AKAHANE, T.; HIRASAWA, A.; TSUDA, H. et al. The origin of stroma surrounding epithelial ovarian cancer cells. **International journal of gynecological pathology**. v.32, n.1, p.26-30, 2013.

ALMEIDA, J.R.C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu. 2004. 61-72p.

ALMEIDA, J.R.C.; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B. et al. Marcadores tumorais: revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.53, n.3, p.305-316, 2007.

ALQASEMI, U.; KUMAVOR, P.; AGUIRRE, A.; ZHU, Q. Recognition algorithm for assisting ovarian cancer diagnosis from coregistered ultrasound and photoacoustic images: *ex vivo* study. **Journal of Biomedical Optics**. v.17, n.12, p.1-10, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2015**. Atlanta, GA, 2015. Disponível em: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/>. Acesso em: 26 de janeiro de 2015.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY (ASCO). Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v.14, n.10, p.2843-2877, 1996.

ARANGO, H.G. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 93-113.

AWAIS, G.M. Serum lactic dehydrogenase levels in the diagnosis and treatment of carcinoma of the ovary. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v.116, n.8, p.1053-1057, 1973.

BAERT, T.; TIMMERMAN, D.; VERGOTE, I.; COOSEMANS, A. Immunological parameters as a new lead in the diagnosis of ovarian cancer. **Facts, Views & Vision in ObGyn**. v.7, n.1, p.67-72, 2015.

BAST, R.C.JR.; FEENEY, M.; LAZARUS, H. et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. **Journal of clinical investigation**. v.68, n.5, p.1331-1337, 1981.

BAUSKIN, A.R.; BROWN, D.A.; KUFFNER, T. et al. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. **Cancer Research**. v.66, n.10, p.4983-4986, 2006.

BELISLE, J.A.; HORIBATA, S.; JENNIFER, G.A. Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. **Molecular cancer**. v.9, n.118, p.1-14, 2010.

BOCK, A.J.; STAVNES, H.T.; KEMPF, T. et al. Expression and clinical role of growth differentiation factor-15 in ovarian carcinoma effusions. **International Journal of Gynecological Cancer**. v.20, n.9, p.1448-1455, 2010. Erratum in: **International Journal of Gynecological Cancer**. v.23, n.2, p.399, 2013.

BOOTCOV, M.R.; BAUSKIN, A.R.; VALENZUELA, S.M. et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.94, n.21, p.11514-11519, 1997.

BOULTON, S.J.Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. **Biochemical Society Transactions**. v.34, n.5, p.633-645, 2006.

BRENNEN, W.N.; ROSEN, D.M.; WANG, H. et al. Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. **Journal of the National Cancer Institute**. v.104, n.17, p.1320-1334, 2012.

BROWN, D.A.; BREIT, S.N.; BURING, J. et al. Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case–control study. **Lancet**. v.359, n.9324, p.2159-2163, 2002.

BROWN, D.A.; WARD, R.L.; BUCKHAULTS, P. et al. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. **Clinical cancer research**. v.9, n.7, p.2642-2650, 2003.

BRUZZESE, F.; HÄGGLÖF, C.; LEONE, A. et al. Local and systemic protumorigenic effects of cancer-associated fibroblast-derived GDF15. **Cancer Research**. v.74, n.13, p.3408-3417, 2014.

CALLAHAN, M.J.; CRUM, C.P.; MEDEIROS, F. et al. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. **Journal of Clinical Oncology**. v.25, n.25, p.3985-3990, 2007.

CECIL, G.L.; AUSIELLO, D. **Tratado de medicina interna**. In: COOPER, D.L. Marcadores tumorais. v.2, 22ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005, 1309-1312p.

CENIK, B.; SEPHTON, C.F.; KUTLUK CENIK, B. et al. Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration. **Journal of Biological Chemistry**. v.287, n.39, p.32298-32306, 2012.

CHEN, Z.; XU, W.R.; QIAN, H. et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. **Journal of Surgical Oncology**. v.99, n.7, p.414-419, 2009.

CHERCHI, P.L.; CAPOBIANCO, G.; AMBROSINI, G. et al. Intracystic evaluation of tumor markers in benign and malignant ovarian pathology. **European journal of gynaecological oncology**. v.23, n.2, p.163-165, 2002.

CHO, H.Y.; KIM, K.; JEON, Y.T. et al. CA19-9 elevation in ovarian mature cystic teratoma: discrimination from ovarian cancer - CA19-9 level in teratoma. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**. v.29, n.19, p.230-235, 2013.

CHOBANIAN, N.; DIETRICH, C.S. Ovarian cancer. **Surgical Clinics North America**. v.88, n.2, 285-299, 2008.

CLARKE-PEARSON, D.L. Clinical practice. Screening for ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**. v.361, n.2, p.170-177, 2009.

COOSEMANS, A.; BAERT, T.; VERGOTE, I. A view on dendritic cell immunotherapy in ovarian cancer: how far have we come? **Facts, Views & Vision in ObGyn**. v.7, n.1, p.73-78, 2015.

CUBILLOS-RUIZ, J.R.; RUTKOWSKI, M.; CONEJO-GARCIA, J.R. Blocking ovarian cancer progression by targeting tumor microenvironmental leukocytes. **Cell Cycle**. v.9, n.2, p.260-268, 2010.

DE MUYNCK, L.; VAN DAMME, P. Cellular effects of progranulin in health and disease. **Journal of Molecular Neuroscience**. v.45,n.3, p.549-560, 2011.

DEDE, M.; GUNGOR, S.; YENEN, M.C. et al. CA19-9 may have clinical significance in mature cystic teratomas of the ovary. **International Journal of Gynecological Cancer**. v.16, n.1, p.189-193, 2006.

DEMORROW, S. Progranulin: a novel regulator of gastrointestinal cancer progression. **Translational gastrointestinal cancer**. v.2, n.3, p.145-151, 2013.

DIAZ-CUETO, L.; ARECHAVALETA-VELASCO, F.; DIAZ-ARIZAGA, A. et al. PKC signaling is involved in the regulation of progranulin (acrogranin/PC-cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) protein expression in human ovarian cancer cell lines. **International Journal of Gynecological Cancer**. v.22, n.6, p.945-950, 2012.

DONALD, C,D.; LADDU, A.; CHANDHAM, P. et al. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. **Anticancer research**. v.21, n.6A, p.3739-3742, 2001.

DOTLIĆ, J.; TERZIĆ, M.; LIKIĆ, I. et al. Evaluation of adnexal masses: correlation between clinical, ultrasound and histopathological findings. **Vojnosanit Pregl**. v.68, n. 10, p.861-866, 2011.

DRAPKIN, R.; VON HORSTEN, H.H.; LIN, Y. et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. **Cancer research**. v.65, n.6, 2162-2169, 2005.

DU, Z.; JIA, D.; LIU, S. et al. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. **Glia**. v.57, n.7, p.724-733, 2009.

EAGLE, K.; LEDERMANN, J.A. Tumor Markers in Ovarian Malignancies. **The Oncologist**. v.2, n.5, p.324-329, 1997.

EDGELL, T.; MARTIN-ROUSSETY, G.; BARKER, G. et al. Phase II biomarker trial of a multimarker diagnostic for ovarian cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v.136, n.7, p.1079-1088, 2010.

EXMAN, P.; TAKAHASHI, T.K.; GATTÁS, G.F. et al. Primary ovary choriocarcinoma: individual DNA polymorphic analysis as a strategy to confirm diagnosis and treatment. **Rare Tumors**. v.5, n.2, p.89-92, 2013.

EZEH, U.I.; TUREK, P.J.; REIJO, R.A.; CLARK, A.T. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. **Cancer**. v.104, n.10, 2255-2565, 2005.

FAIRFIELD, K.M.; HANKINSON, S.E.; ROSNER, B.A. et al. Risk of ovarian carcinoma and consumption of vitamins A, C and E and specific carotenoids: a prospective analysis. **Cancer**. v.92, n.9, p.2318-2326, 2001.

FEHM, T.; NEUBAUER, H.; BRÄUTIGAM, K. et al. Diagnostik und therapie des ovarialkarzinoms. Innovative techniken. **Der Gynäkologe**. v.43, n.7, p.586-594, 2010.

FINCH, A.; SHAW, P.; ROSEN, B.; et al. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. **Gynecologic Oncology**.v.100, n.1, p.58-64, 2006.

FISHMAN, D.; COHEN, L.; BLANK, S.V. et al. The role of ultrasound evaluation in the detection of early-stage epithelial ovarian cancer. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v.192, n.4, p.1214-1221, 2005.

FRANCO, O.E.; SHAW, A.K.; STRAND, D.W.; HAYWARD, S.W. Cancer associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. **Seminars in cell & developmental biology**. v.21, n.1, p.33-39, 2012.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; CARPI, A. et al. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.58, n.1, p.24-38, 2004.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; CONTE, P.F.; GENAZZANI, A.R. Consolidation and maintenance treatments for patients with advanced epithelial ovarian cancer in complete response after firstline chemotherapy: a review of the literature. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v.55, n.2, p.153-166, 2005.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; ZOLA, P. et al. Surveillance procedures for patients treated for epithelial ovarian cancer: a review of the literature. **International Journal of Gynecological Cancer**. v.17, n.1, p.21-31, 2007.

GALGANO, M.T.; HAMPTON, G.M.; FRIERSON, H.F.JR. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. **Modern pathology**. v.19, n.6, p.847-853, 2006.

GAYTHER, S. A.; RUSSELL, P.; HARRINGTON, P. et al. The contribution of germline BRCA1 and BRCA2 mutations to familial ovarian cancer: no evidence for other ovarian cancer-susceptibility genes. **American Journal of Human Genetics**. v.65, n.4, p.1021-1029, 1999.

GERAGHTY, J.G.; COVENEY, E.C.; SHERRY, F. et al. CA 15-3 in patients with locoregional and metastatic breast carcinoma. **Cancer**. v.70, n.12, p.2831-2834, 1992.

GRINER, S.E.; JOSHI, J.P.; NAHTA, R. Growth differentiation factor 15 stimulates rapamycin-sensitive ovarian cancer cell growth and invasion. **Biochemical pharmacology**. v.85, n.1, p.46-58, 2013.

GUADAGNI, F.; MARTH, C.; ZEIMET, A.G. et al. Evaluation of tumor-associated glycoprotein-72 and CA 125 serum markers in patients with gynecologic diseases. **American journal of obstetrics & gynecology**. v.171, n. 5, p.1183-1191, 1994.

GUIMARÃES, R.C.; RODRIGUES, V.H.; PÁDUA, C.A.J.; ANDRADE, F.A.F. Uso dos marcadores tumorais na prática clínica. **Prática Hospitalar**. v.4, n.23, p.1-8, 2002.

GWINN, M.L.; LEE, N.C.; RHODES, P.H.; et al. Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. **Journal of Clinical Epidemiology**. v.43, n.6. p.559-568, 1990.

HAN, J.J.; YU, M.; HOUSTON, N. et al. Progranulin is a potential prognostic biomarker in advanced epithelial ovarian cancers. **Gynecologic Oncology**. v.120, n.1, p.5-10, 2011.

HE, C.Z.; ZHANG, K.H.; LI, Q. et al. Combined use of AFP, CEA, CA125 and CAl9-9 improves the sensitivity for the diagnosis of gastric cancer. **BMC gastroenterology**. v.13, n.87, p.1-5, 2013.

HELAL, TEL-A.; ALLA, A.E.; LABAN, M.A.; FAHMY, R.M. Immunophenotyping of tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian carcinoma. **Pathology & Oncology Research**. v.10, n.2, p.80-84, 2004.

HELLSTRÖM, I.; RAYCRAFT, J.; HAYDEN-LEDBETTER, M. et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. **Cancer research**. v.63, n.13, p.3695-3700, 2003.

HILPERT, F.; KRAUSE, G.; VENHOFF, L. et al. Epithelial ovarian cancer. **Therapeutische Umschau**. v.64, n.7, p.375-380, 2007.

HO, J.C.; IP, Y.C.; CHEUNG, S.T. et al. Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. **Hepatology**. v.47, n.5, p.1524-1532, 2008.

HOCHEDLINGER, K.; YAMADA, Y.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. **Cell**. v.121, n.3, p.465-477, 2005.

HORIUCHI, A.; ITOH, K.; SHIMIZU, M. et al. Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. **Gynecologic Oncology**. v.88, n.3, p.309-317, 2003.

HORM, T.M.; SCHROEDER, J.A. MUC1 and metastatic cancer: Expression, function and therapeutic targeting. **Cell adhesion & migration**. v.7, n.2, p.187-198, 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Hormonal contraception and postmenopausal hormonal therapy. v.72, Lyon: IARC Press. 1999. 156-168p.

ISONISHI, S.; OGURA, A.; KIYOKAWA, T.; SUZUKI, M. et al. Alpha-fetoprotein (AFP)-producing ovarian tumor in an elderly woman. **International journal of clinical oncology**. v.14, n.1,p.70-73, 2009.

JACOBS, I.; BAST, R.C.JR. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. **Human Reproduction**. v.4, n.1, p.1-12, 1989.

JIAN, J.; KONOPKA, J.; LIU, C. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**. v.93, n.2, p.199-208, 2013.

KARAN, D.; HOLZBEIERLEIN, J.; THRASHER, J.B. Macrophage inhibitory cytokine-1: possible bridge molecule of inflammation and prostate cancer. **Cancer research**. v.69, n.1, p.2-5, 2009.

KAROUBI, G.; GUGGER, M.; SCHMID, R.; DUTLY, A. OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention. **Interactive cardiovascular and thoracic surgery**. v.8, n.4, p.393-397, 2009.

KAWAI, M.; FURUHASHI, Y.; KANO, T. et al. Alpha-fetoprotein in malignant germ cell tumors of the ovary. **Gynecologic Oncology**. v.39, n.2, p.160-166, 1990.

KIM, J.H.; PARK, C.W.; UM, D. et al. Mass spectrometric screening of ovarian cancer with serum glycans. **Disease markers**. v.2014, n. 2014, p.1-9, 2014.

KINDELBERGER, D.W.; LEE, Y.; MIRON, A. et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. **American Journal of Surgical Pathology**. v.31, n.2, p.161-169, 2007.

KIRCHHOFF, C.; HABBEN, I.; IVELL, R.; KRULL, N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. **Biology of reproduction**. v.45, n.2, 350-357, 1991.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v.44, n.2, p.143-161, 2002.

KNUTSON, K.L.; CURIEL, T.J.; SALAZAR, L.; DISIS, M.L. Immunologic principles and immunotherapeutic approaches in ovarian cancer. **Hematology/oncology clinics of North America**. v.17, n.4, p.1051-1073, 2003.

KÖBEL, M.; KALLOGER, S.E.; BOYD N. et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. **Public Library of Science Medicine**. v.5, n.12, p.1749-1760, 2008.

KONDALSAMY-CHENNAKESAVAN, S.; HACKETHAL, A.; BOWTELL, D. et al. Differentiating stage 1 epithelial ovarian cancer from benign ovarian tumours using a combination of tumour markers HE4, CA125, and CEA and patient's age. **Gynecologic Oncology**. v.129, n.3, p.467-471, 2013.

KOO, D.H.; PARK, C.Y.; LEE, E.S. et al. Progranulin as a prognostic biomarker for breast cancer recurrence in patients who had hormone receptor-positive tumors: a cohort study. **Public Library of Science One**. v.7,n.6, p.1-6, 2012.

KOOPMANN, J.; ROSENZWEIG, C.N.; ZHANG, Z. et al. Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. **Clinical cancer research**. v.12, n.2, p.442-446, 2006.

LAMY, P.J.; ROQUES, S.; VIGLIANTI, C. et al. HE4, a novel marker for epithelial ovarian cancer: evaluation of analytical performances. **Annales de Biologie Clinique**. v.68, n.3, p.325-329,2010.

LANDEN, C.N.JR.; BIRRER, M.J.; SOOD, A.K. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v.26, n.6, p.995-1005, 2008.

LAVOUÉ, V.; THÉDREZ, A.; LEVÊQUE, J. et al. Immunity of human epithelial ovarian carcinoma: the paradigm of immune suppression in cancer. **Journal of Translational Medicine**. v.11, n.147, p.1-12, 2013.

LAWTON, L.N.; BONALDO, M.F.; JELENC, P.C. et al. Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. **Gene**. v.203, n.1, p.17-26, 1997.

LERMAN, C.; HUGHES, C.; LEMON, S.J. et al. What you don't know can hurt you: adverse psychologic effects in members of BRCA1-linked and BRCA2-linked families who decline genetic testing. **Journal of Clinical Oncology**. v.16, n.5, p.1650-1654, 1998.

LIPKUS, I.M.; KLEIN, W.M.; RIMER, B.K. Communicating breast cancer risks to women using different formats. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v.10, n.8, p.895-898, 2001.

LV, L.; YANG, K.; WU, H. et al. Pure choriocarcinoma of the ovary: a case report. **Journal of gynecologic oncology**. v.22, n.2, 135-139, 2011.

MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGIYAMA, M.M. et al. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arquivos Médicos do ABC**. v.30, n.1, p.19-25, 2005.

MEDEIROS, F.; MUTO, M.G.; LEE, Y.; et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. **American Journal of Surgical Pathology**. v.30, n.2, p.230-236, 2006.

MEGURO, S.; YASUDA, M. α-Fetoprotein-producing ovarian tumor in a postmenopausal woman with germ cell differentiation. **Annals of diagnostic pathology**. v.17, n.1, p.140-4, 2013.

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. **Journal of cellular physiology**. v.224, n.3, p.626-635, 2010.

MIRONOV, S.; AKIN, O.; PANDIT-TASKAR, N.; HANN, L.E. Ovarian Cancer. **Radiologic Clinics of North America**. v.45, n.1, p.149-166, 2007.

MOK, S.C.; KWONG, J.; WELCH, W.R. et al. Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. **Disease Markers**; v.23, n.5-6, p.367-376, 2007.

MONAMI, G.; EMILIOZZI, V.; BITTO, A. et al. Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth. **The American journal of pathology**. v.174, n.3, p.1037-1047, 2009.

MOORE, A.G.; BROWN, D.A.; FAIRLIE, W.D. et al. The transforming growth factor-ss superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. v.85, n.12, p.4781-4788, 2000.

MOORE, R.G.; MCMEEKIN, D.S.; BROWN, A.K. et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. **Gynecologic Oncology**. v.112, n.1, p.40-46, 2009.

MOR, G.; VISINTIN, I.; LAI, Y. et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.102, n.21, p.7677-7682, 2005.

MORETTA, L.; BOTTINO, C.; PENDE, D. et al. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. **European journal of immunology**. v.32, n.5, p.1205-1211, 2002.

MORIKAWA, Y.; KAWAI, M.; KANO, T. et al. Clinical remission criteria for epithelial carcinoma of the ovary. **Gynecologic Oncology**. v.48, n.3, p.342-348, 1993.

MOTOYAMA, T.; WATANABE, H.; TAKEUCHI, S. et al. Cancer antigen 125, carcinoembryonic antigen, and carbohydrate determinant 19-9 in ovarian tumors. **Cancer**. v.66, n.12, p.2628-2635, 1990.

MURTA, E.F.; DA SILVA, C.S.; GOMES, R.A. et al. Ultrasonographic criteria and tumor marker assay are good procedures for the diagnosis of ovarian neoplasia in preselected outpatients. **European journal of gynaecological oncology**.v.25, n.6, p.707-712, 2004.

MURTA, E.F.; NOMELINI, R.S. Early diagnosis and predictors of malignancy of adnexal masses. **Current opinion in obstetrics & gynecology**. v.18, n.1, p.14-19, 2006.

MURTA, E.F.C.; ANDRADE, J.M.; BIGHETTI, S. Aspectos epidemiológicos do câncer de ovário. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v.105, n.6, p.269-274, 1995.

NOY, R.; POLLARD, J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**. v.41, n. 1,p.49-61, 2014. Review. Erratum in: **Immunity**. v.41, n. 5, p.866, 2014.

NUNES, N.; AMBLER, G.; FOO, X. et al. Use of IOTA simple rules for diagnosis of ovarian cancer: meta-analysis. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**. v.44, n.5, p.503-514, 2014.

NUSTAD, K.; BAST, R.C.JR.; BRIEN, T.J. et al. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. **Tumor biology**. v.17, n.4, p.196-219, 1996.

OLIVIER, R.I.; LUBSEN-BRANDSMA, M.A.; VERHOEF, S.; VAN BEURDEN, M. CA125 and transvaginal ultrasound monitoring in high-risk women cannot prevent the diagnosis of advanced ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. v.100, n.1, p.20-26, 2006.

ÖSTMAN, A.; AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players. **Current opinion in genetics & development**. v.19, n.1, p.67-73, 2009.

ÖZEL, E.; PEŞTERELI, H.E.; ŞIMŞEK, T. et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in ovarian surface epithelial carcinomas: is there any correlation with angiogenesis or clinicopathologic parameters? **International Journal of Gynecological Cancer**. v.16, n.2, p.549-555, 2006.

PANET, A.; KHORANA, H.G. Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. **Journal of Biological Chemistry**. v.249, n.16, p.5213-5221, 1974.

PARAMASIVAM, S.; TRIPCONY, L.; CRANDON, A. et al. Prognostic importance of preoperative CA-125 in International Federation of Gynecology and Obstetrics stage I epithelial ovarian cancer: an Australian multicenter study. **Journal of Clinical Oncology**. v.23, n.25, p.5938-5942, 2005.

PESCE, M.; GROSS, M.K.; SCHÖLER, H.R. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. **Bioessays**. v.20, n.9, 722-732, 1998. Erratum in: **Bioessays**. v.20, n.12, p.1056, 1998.

PONNUSAMY, M.P.; VENKATRAMAN, G.; SINGH, A.P. et al. Expression of TAG-72 in ovarian cancer and its correlation with tumor stage and patient prognosis. **Cancer letters**. v.251, n.2, p.247-257, 2007.

PRZYBYCIN, C.G.; KURMAN, R.J.; RONNETT, B.M. et al. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? **American Journal of Surgical Pathology**. v.34, n. 10, p.1407-1416, 2010.

REBBECK, T.R.; LYNCH, H.T.; NEUHAUSEN, S.L.; et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **New England Journal of Medicine** v.346, n.21, p.1616-1622, 2002.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário - papel dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.27, n.4, p.222-227, 2005.

RIMAN, T.; DICKMAN, P.W.; NILSSON, S. et al. Hormone replacement therapy and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women. **Journal of the National Cancer Institute**. v.94, n.7, p.497-504, 2002.

RISCH, H.A. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. **Journal of the National Cancer Institute**.v.90, n.23, p.1774-1786, 1998.

RISCH, H.A.; MCLAUGHLIN, J.R.; COLE, D.E. et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. **American Journal of Human Genetics**. v.68, n.3, p.700-710, 2001.

RISCH, H.A.; WEISS, N.S.; LYON, J.L. et al. Events of reproductive life and the incidence of epithelial ovarian cancer. **American Journal of Epidemiology**. v.117, n.2, p.128-139, 1983.

ROETT, M.A.; EVANS, P. Ovarian cancer: an overview. **American Family Physician**. v.80, n.6, p.609-616, 2009.

ROSEN, E.M.; FAN, S.; PESTELL R.G.; GOLDBERG, I.D. BRCA1 gene in breast cancer. **Journal of Cellular Physiology**. v.196, n.1, p.19-41, 2003.

ROSSI, A.C.; DI VAGNO, G.; CORMIO, G. et al. A retrospective study of preoperative CA 125 levels in 82 patients with ovarian cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. v.269, n.4, p.263-265, 2004.

RUBIN, S.C. Surgery for ovarian cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. v.6, n.4, p.851-865, 1992.

RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. **Immunological Reviews**. v.241, n.1, p.260-268, 2011.

SANTILLAN, A.; GARG, R.; ZAHURAK, M.L. et al. Risk of epithelial ovarian cancer recurrence in patients with rising serum CA-125 levels within the normal range. **Journal of Clinical Oncology**. v.23, n.36, p.9338-9343, 2005.

SATO, E.; OLSON, S.H.; AHN, J. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.102, n.51, p.18538-18543, 2005.

SCHILDKRAUT, J.M.; THOMPSON, W.D.; Familial ovarian cancer: a population based case control study. **American Journal of Epidemiology**. v.128, n.3, p.456-466, 1988.

SCHMELER, K.M.; SUN C. C.; BODURKA D. C. et al. Prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy compared with surveillance in women with BRCA mutations. **Obstetrics & Gynecology**. v.108, n.3, p.515-520, 2003.

SCHNEIDER, D.; HALPERIN, R.; LANGER, R. et al. Peritoneal fluid lactate dehydrogenase in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. v.66, n.3, p.399-404, 1997.

SCHOUTEN, L.J.; RIVERA, C.; HUNTER, D.J. et al. Height, body mass index, and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v.17, n.4, p.902-912, 2008.

SCHWARTZ, M. Specialized techniques of cancer management and diagnosis. Section 3. Cancer markers. In: DEVITA, V.; HELLMAN, S.JR.; ROSENBERG, S. **Cancer: Principles & practice of oncology**. Philadelphia: JB Lippincott. 1993, 531-542p.

SERRERO, G.; HAWKINS, D.M.; YUE, B. et al. Progranulin (GP88) tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence in breast cancer patients diagnosed with estrogen receptor positive invasive ductal carcinoma. **Breast Cancer Research**. v.14, n.1R26, p.1-12, 2012.

SHAW, P.A.; ROUZBAHMAN, M.; PIZER, E.S.; et al. Candidate serous cancer precursors in fallopian tube epithelium of BRCA1/2 mutation carriers. **Modern Pathology**. v.22, n.9, p.1133-1138, 2009.

SHI, F.D.; LJUNGGREN, H.G.; SARVETNICK, N. Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. **Trends in immunology**. v.22, n.2, p.97-101, 2001.

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**. v.18, n.5, p.349-355, 2008.

SIMAGA, S.; OSMAK, M.; BABIC, D. et al. Quantitative biochemical analysis of lactate dehydrogenase in human ovarian tissues: correlation with tumor grade. **International Journal of Gynecological Cancer**. v.15, n.3, p.438-444, 2005.

SOCIETY OF GYNECOLOGIC ONCOLOGISTS (SGO). Clinical practice committee estatement on prophylactic salpingo-oophorectomy. **Gynecologic Oncology**. v.98, n.2, p.179-181, 2005.

STAFF, A.C.; BOCK, A.J.; BECKER, C. et al. Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. v.118, n.3, 237-243, 2010.

STAFF, A.C.; TROVIK, J.; ERIKSSON, A.G. et al. Elevated plasma growth differentiation factor-15 correlates with lymph node metastases and poor survival in endometrial cancer. **Clinical cancer research**. v.17, n.14, p.4825-4833, 2011.

STEFFENSEN, K.D.A.; WALDSTRØM, M.; BRANDSLUND, I.; JAKOBSEN, A. Prognostic impact of prechemotherapy serum levels of HER2, CA125, and HE4 in ovarian cancer patients. **International Journal of Gynecological Cancer**. v.21, n.6, p.1040-1047, 2011.

SUGULLE, M.; DECHEND, R.; HERSE, F. et al. Circulating and placental growth-differentiation factor 15 in preeclampsia and in pregnancy complicated by diabetes mellitus. **Hypertension**. v.54, n.1,p.106-112, 2009.

SUNG, M.T.; JONES, T.D.; BECK, S.D. et al. OCT4 is superior to CD30 in the diagnosis of metastatic embryonal carcinomas after chemotherapy. **Human Pathology**. v.37, n.6, p.662-667, 2006.

TAVARES-MURTA, B.M.; CUNHA, F.Q.; MIRANDA, R. et al. Differential tumor microenvironment in human ovarian cystic tumors. **Tumori**. v.90, n.5, p.491-497, 2004.

TERZIĆ, M.; DOTLIĆ, J.; LADJEVIĆ, I.L. et al. Evaluation of the risk malignancy index diagnostic value in patients with adnexal masses. **Vojnosanit Pregl**. v.68, n.7, p.589-593, 2011.

TOGASHI, K. Ovarian cancer: the clinical role of US, CT, and MRI. **European Radiology**. v.13, n.6, p.87-104, 2003.

TOH, H.; CAO, M.; DANIELS, E.; BATEMAN, A. Expression of the growth factor progranulin in endothelial cells influences growth and development of blood vessels: a novel mouse model. **Public Library of Science One**. v.8, n.5, p.1-18, 2013.

TRUDEL, D.; TÊTU, B.; GRÉGOIRE, J. et al. Human epididymis protein 4 (HE4) and ovarian cancer prognosis. **Gynecologic oncology**. v.127, n.3, p.511-515, 2012.

URBAN, N.; DRESCHER, C. Potential and limitations in early diagnosis of ovarian cancer. In: Coukos, G.; Berchuck, A.; Ozols, R.; editors. **Ovarian Cancer: State of the Art and Future Directions in Translational Research**. Advances in Experimental Medicine and Biology. v.622. New York: Springer. 2008. 3-14p.

VAN CALSTER, B.; VAN HOORDE, K.; VALENTIN, L. et al. Evaluating the risk of ovarian cancer before surgery using the ADNEX model to differentiate between benign, borderline, early and advanced stage invasive, and secondary metastatic tumours: prospective multicentre diagnostic study. **British Medical Journal**. v.349, n.g5920, p.1-14, 2014.

VAN NIEKERK, C.C.; RAMAEKERS, F.C.; HANSELAAR, A.G. et al. Changes in expression of differentiation markers between normal ovarian cells and derived tumors. **The American journal of pathology**. v.142, n.1, p.157-177, 1993.

VARTIAINEN, J.; LEHTOVIRTA, P.; FINNE, P. et al. Preoperative serum concentration of hCGbeta as a prognostic factor in ovarian cancer. **International journal of cancer**. v.95, n.5, p.313-316, 2001.

VENKITARAMAN, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell** v.108, n. 2, p.171-182, 2002.

VRABIE, C.D.; PETRESCU, A.; WALLER, M.; DINA, I. Clinical factors and biomarkers in ovarian tumors development. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**. v.49, n.3, p.327-338, 2008.

WANG, X.B.; JIANG, X.R.; YU, X.Y. et al. Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy. **Cancer Science**. v.105, n.2, p.176-185, 2014.

WELSH, J.B.; SAPINOSO, L.M.; KERN, S.G. et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.100, n.6, p.3410-3415, 2003.

WERNESS, B.A.; RAMUS, S.J.; WHITTEMORE, A.S. et al. Histopathology of familial ovarian tumors in women from families with and without germ-line BRCA1 mutations. **Human Pathology**. v.31, n.11, p.1420-1424, 2000.

WHITTEMORE, A.S.; HARRIS, R.; ITNYRE, J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. **American Journal of Epidemiology**. v.136, n.10, p.1184-1203, 1992.

WOOSTER, R.; NEUHAUSEN, S.L.; MANGION, J. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12–13. **Science**. v.265, n.5181, p.2088-2090, 1994.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science** v.95, n.11, p.866-871, 2004.

YÜCE, K.; BAYKAL, C.; GENÇ, C. et al. Diagnostic and prognostic value of serum and peritoneal fluid lactate dehydrogenase in epithelial ovarian cancer. **European journal of gynaecological oncology**. v.22, n.3, p.228-232, 2001.

ZHANG, D.; GAO, J.; ZHU, L. et al. Chemoresistance is associated with MUC1 and Lewis y Antigen expression in ovarian epithelial cancers. **International journal of molecular sciences**. v.14, n.6, p.11024-11033, 2013.

ZHANG, J.; LI, Y.L.; ZHOU, C.Y. et al. Expression of octamer-4 in serous and mucinous ovarian carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**. v.63, n.10, p.879-883, 2010.

ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA, J.R.; KATSAROS, D. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **The New England journal of medicine**. v.348, n.3, 203-213, 2003.

ZHANG, Y.; DENG, Z.S.; LIAO, M.M. et al. Tumor associated glycoprotein-72 is a novel marker for poor survival in hepatocellular carcinoma. **Pathology & Oncology Research**. v.18, n.4, p.911-916, 2012.

ZHANG F.; ZHANG Z.L. The Diagnostic Value of Transvaginal Sonograph (TVS), Color Doppler, and Serum Tumor Marker CA125, CEA, and AFP in Ovarian Cancer. **Cell Biochemistry and Biophysics**. DOI 10.1007/s12013-014-0463-x, 2015.

ANEXOS

ANEXO A - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar – Bairro Nossa Senhora da Abadia
38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854
E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

IDENTIFICAÇÃO
TÍTULO DO PROJETO: MARCADORES TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA E LOCAL EM NEOPLASIAS DE OVÁRIO
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: ROSEKEILA SIMÕES NOMELINI
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 02/08/2011
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2061

PARECER

De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 18 de novembro de 2011.

Profª. Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP/UFTM

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: **"*GDF-15 tecidual e sérico em neoplasias de ovário*"**

Eu, ..., Registro Hospitalar nº ....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo e autorizo a publicação em forma de artigo científico sobre minha doença.

Uberaba, .../ ...../.....

_____ _____

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal Documento de identidade

Telefone de contato da paciente: _____

_____ _____

Assinatura do pesquisador responsável Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: 34-3318-5326

ANEXO C - CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES OVARIANOS SEGUNDO A OMS

1 TUMORES EPITELIAIS COMUNS

1.1 TUMORES SEROSOS

1.1.1 Benignos

1.1.1.1 Cistoadenoma e cistoadenoma papilífero

1.1.1.2 Papiloma superficial

1.1.1.3 Adenofibroma e cistoadenoma fibroma

1.1.2 *Borderline*

1.1.2.1 Cistoadenoma e cistoadenoma papilífero

1.1.2.2 Papiloma superficial

1.1.2.3 Adenofibroma e cistoadenofibroma

1.1.3 Malignos

1.1.3.1 Adenocarcinoma, adenocarcinoma papilífero e cistoadenocarcinoma papilífero

1.1.3.2 Carcinoma papilífero superficial

1.1.3.3 Adenofibroma maligno e cistoadenofibroma

1.2 TUMORES MUCINOSOS

1.2.1 Benignos

1.2.1.1 Adenoma e cistoadenoma

1.2.1.2 Adenofibroma e cistoadenofibroma

1.2.2 *Borderline*

1.2.2.1 Adenoma e cistoadenoma

1.2.2.2 Adenofibroma e cistoadenofibroma

1.2.3 Malignos

1.2.3.1 Adenocarcinoma e cistoadenocarcinoma

1.2.3.2 Adenofibroma maligno e cistoadenofibroma

1.3 TUMORES ENDOMETRIÓIDES

1.3.1 Benignos

1.3.1.1 Adenoma e cistoadenoma

1.3.1.2 Adenofibroma e cistoadenofibroma

1.3.2 *Borderline*

1.3.2.1 Adenoma e cistoadenoma

1.3.2.2 Adenofibroma e cistoadenofibroma

1.3.3 Malignos

1.3.3.1 Carcinoma

1.3.3.1.1 Adenocarcinoma

1.3.3.1.2 Adenoacantoma

1.3.3.1.3 Adenofibroma maligno

1.3.3.2 Sarcomas do estroma endometrióide

1.3.3.3 Tumores mesodérmicos mistos

1.4 TUMORES DAS CÉLULAS CLARAS (MESONEFRÓIDE)

1.4.1 Benignos: adenofibroma

1.4.2 *Borderline*

1.4.3 Malignos: adenocarcinoma e carcinoma

1.5 TUMORES DE BRENNER

1.5.1 Benignos

1.5.2 *Borderline*

1.5.3 Malignos

1.6 TUMORES EPITELIAIS MISTOS

1.6.1 Benignos

1.6.2 *Borderline*

1.6.3 Malignos

1.7 CARCINOMAS INDIFERENCIADOS

1.8 TUMORES EPITELIAIS NÃO ESPECIFICADOS

2 TUMORES DOS CORDÕES SEXUAIS

2.1 TUMORES DAS CÉLULAS DA GRANULOSAS-ESTROMÁTICAS

2.1.1 Tumores de células granulosas

2.1.2 Tumores do grupo tecoma-fibroma

2.2 ANDROBLASTOMAS (TUMORES DE SERTÓLIO-LEYDIG)

2.3 GINANDROBLASTOMAS

2.4 NÃO CLASSIFICADOS

3 TUMORES DE CÉLULAS LIPOÍDICAS

4 TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS

4.1 DISGERMINOMAS

4.2 TUMORES DO SEIO ENDODÉRMICO

4.3 CARCINOMA EMBRIONÁRIO

4.4 POLIEMBRIOMA

4.5 CORIOCARCINOMA

4.6 TERATOMAS

4.6.1 Imaturos

4.6.2 Maduros

4.6.2.1 Sólidos

4.6.2.2 Císticos

4.6.2.2.1 Cistos dermóides

4.6.2.2.2 Cisto dermóide com transformação maligna

4.6.3 Especializados

4.6.3.1 Struma ovarii

4.6.3.2 Carcinóide

4.6.3.3 Outros

4.7 FORMAS MISTAS

5 GONADOBLASTOMAS

5.1 PUROS

5.2 MISTOS

6 TUMORES DE TECIDOS MOLES INESPECÍFICOS DO OVÁRIO

7 TUMORES NÃO CLASSIFICADOS

8 TUMORES METASTÁTICOS

9 LESÕES TUMOR-SÍMILES

9.1 LUTEOMA GRAVÍDICO

9.2 HIPERPLASIA DO ESTROMA OVARIANO E HIPERTECOSE

9.3 EDEMA MACIÇO

9.4 CISTOS FOLICULARES SOLITÁRIOS E DE CORPO LÚTEO

9.5 OVÁRIOS POLICÍSTICOS

9.6 CISTOS LUTEÍNICOS MÚLTIPLOS

9.7 ENDOMETRIOSE

9.8 INCLUSÕES CÍSTICAS DA SUPERFÍCIE EPITELIAL

9.9 CISTOS SIMPLES

9.10 LESÕES INFLAMATÓRIAS

9.11 CISTOS PARAOVARIANOS

ANEXO D - ESTADIAMENTO DAS NEOPLASIAS MALIGNAS DE OVÁRIO SEGUNDO A FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA (FIGO)

- ✓ IA: Tumor restrito a um ovário, sem ascite, cápsula intacta
- ✓ IB: Tumor restrito aos dois ovários, sem ascite, cápsula intacta
- ✓ IC: Um ou dois ovários; citologia peritoneal positiva (presença de células neoplásicas), implante ou cápsula rota
- ✓ IIA: Tumor acomete útero e/ou tuba uterina
- ✓ IIB: Qualquer tecido intrapélvico
- ✓ IIC: IIA ou IIB, citologia peritoneal positiva (presença de células neoplásicas)
- ✓ IIIA: Histologia positiva, sem alterações macroscópicas
- ✓ IIIB: Nódulos de até 2 cm
- ✓ IIIC: Nódulos maiores que 2 cm; nódulos inguinais ou retroperitoneais positivos
- ✓ IV: Metástase à distância