

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

AGRIMALDO MARTINS FILHO

CORRELAÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO TECIDUAIS COM FATORES
PROGNÓSTICOS EM PACIENTES COM NEOPLASIAS MALIGNAS DE OVÁRIO

UBERABA

2013

Agrimaldo Martins Filho

Correlação de citocinas e óxido nítrico teciduais com fatores prognósticos em pacientes com neoplasias malignas de ovário

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosekeila Simões
Nomelini

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando
Candido Murta

Uberaba

2013

Uberaba, 30 de abril de 2013.

À
COORDENADORIA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE
UFTM

Defesa de tese e exame final de **AGRIMALDO MARTINS FILHO**,
candidato(a) ao grau de Mestre em Ciências – Patologia Humana.

A Comissão Examinadora que esta subscreve comunica a esta
Coordenadoria, para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Tese de
Mestrado “**CORRELAÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO COM FATORES
PROGNÓSTICOS EM NEOPLASIAS MALIGNAS DE OVÁRIO**”, do Programa de Pós-
graduação em Ciências da Saúde (área de concentração Patologia Humana), bem como
ao exame final.

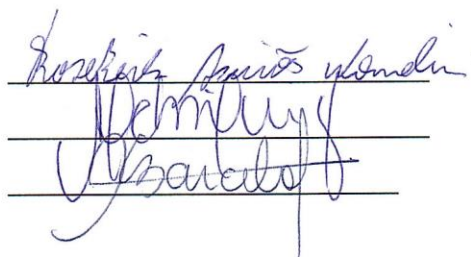
O(a) candidato(a) foi considerado(a) APROVADO.

A COMISSÃO:

Rosekeila Simões Nomelini – orientadora

Angélica Lemos Debs Diniz (examinadora)

Ana Cristina Macêdo Barcelos (examinadora)



A Deus,

Pela vida, pela força e garra e por estar sempre comigo, iluminando cada momento e dando sabedoria e discernimento para optar, coragem para lutar e perseverança para vencer.

“Não posso caminhar com minhas próprias forças, Contigo é bem melhor!”

Contigo o pouco é muito e sem Ti o tudo é nada.

Minha vida é o Teu mandar e o Teu caminho é o meu.

Não eu não posso, não vou dar um passo sequer se Deus não for comigo não irei jamais”

(Adriana Arydes)

Ao meu pai Agrimaldo,

Pelo afeto, pelo amor incondicional, pelas lições, pela dedicação e companheirismo e por ter acreditado em meus sonhos apoiando-me sempre com toda confiança. Obrigado pai por ter me ensinado a viver com dignidade e caráter.

A minha mãe Maria Ildine,

Você partiu antes que esse momento chegasse. Partiu deixando uma saudade imensa, mas mesmo não estando fisicamente entre nós, a sua alma viva de amor, amizade e exemplo de pessoa é o que me impulsiona adiante, incentivando-me a ser uma pessoa capaz de lutar pelos meus sonhos.

Aos meus irmãos e familiares,

Pelo apoio, pelo amor e confiança, pelos bons momentos que passamos juntos e pelos conselhos e risos que me proporcionaram.

A Professora Rosekeila,

Pela orientação e dedicação que me foi depositada, por demonstrar paciência e com disposição durante toda a construção desse trabalho e por estar sempre disposta a ensinar e mostrar o caminho certo e correto, solucionando dúvidas e vieses que por ventura surgiram no decorrer do caminho.

AGRADECIMENTOS

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

A minha madrasta Magda, pelo incentivo a realização de meus sonhos, pela preocupação e carinho e por desempenhar o papel de mãe cuidando e zelando por mim como se fosse um filho gerado.

A amiga Millena, pelo apoio, compreensão e ajuda em todas as etapas da construção deste trabalho e por estar comigo sempre, demonstrando sua total amizade.

Aos meus amigos, por estarem sempre comigo, pelos conselhos, pela companhia e amizade.

Ao Professor Eddie Fernando Murta, pela coorientação da tese, pela disponibilidade e pela amizade demonstrada desde o início do trabalho.

A Professora Renata Margarida Etchebehere, pela atenção, pela colaboração e por apresentar-se sempre disposta a ajudar e pela contribuição no ensino.

A Professora Sheila Jorge Adad, pela ajuda na escolha dos melhores cortes histológicos de grande parte dos casos destinados a imuno-histoquímica.

Ao Professor Thales Parenti, pela ajuda e apoio na seleção dos cortes histológicos para a imuno-histoquímica e na graduação dos cortes.

A Professora Beatriz Martins Tavares Murta, por disponibilizar todos os recursos da Disciplina de Farmacologia.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em patologia, pela contribuição e apoio ao ensino.

A Eliângela de Castro Cobo, e a Luzia Helena Gonçalves dos Santos, pela amizade e apoio e pela grande eficiência na realização da técnica de imuno-histoquímica e no corte dos blocos de parafina.

Ao Douglas Cobo Micheli, e ao Januário Barbosa dos Santos, pelo auxílio no processamento de materiais biológicos e armazenamento dos mesmos.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Cirúrgica, pelo apoio, pela atenção e disposição.

Aos funcionários do Ambulatório de Oncologia Ginecológica e Mastologia, as Secretarias da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, pelo apoio, pela atenção e disposição.

Aos funcionários do Setor de Arquivamento de Prontuários, pela atenção, pela disposição e apoio.

À equipe de enfermagem do setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), em especial a Jaqueline, pelo apoio e ajuda nas coletas.

Ao Dr. Cleber Sérgio da Silva, e ao Dr. Paulo Maluf, pela paciência e auxílio durante a coleta do material nas cirurgias no bloco cirúrgico.

Aos residentes da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, em especial ao residente Marco Aurélio Trovó, e aos alunos da graduação em Medicina, pela paciência e apoio nas cirurgias e coleta de material no bloco cirúrgico.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi correlacionar a marcação tecidual por imuno-histoquímica de citocinas (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF- α) e NOSi com parâmetros clínicos e patológicos de pacientes com tumor maligno de ovário primário. Como material e métodos, foram avaliadas prospectivamente 40 pacientes submetidas a tratamento cirúrgico de cistos ovarianos, de acordo com critérios pré-estabelecidos e com diagnóstico confirmado de câncer de ovário. O estudo imuno-histoquímico para citocinas (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF- α) e NOSi foi realizado. Na análise estatística, foi utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância menor que 0,05. Como resultado foi verificado que o grau histológico 1 foi significativamente correlacionado com imuno-histoquímica de intensidades forte (2 e 3) para o TNF- α ($p = 0,0028$). Ainda em relação ao TNF- α , estádios iniciais (I e II, FIGO) foram mais relacionados à imuno-histoquímica de intensidades 2 e 3 no limiar de significância estatística ($p = 0,0525$). A marcação imuno-histoquímica 2 e 3 para IL-5 foi relacionada a uma sobrevida livre de doença igual ou inferior a 24 meses, o que sugere que é um fator de mau prognóstico, mas não houve significância estatística ($p = 0,1771$). Não houve significância estatística em relação a outras citocinas estudadas, nem em relação à NOSi. O estudo concluiu que a marcação imuno-histoquímica de forte intensidade para TNF- α está relacionada com neoplasia maligna de ovário grau histológico 1 e com estadiamentos mais iniciais (I e II, FIGO). O estudo da imunologia no câncer de ovário pode ajudar a compreender melhor os padrões de resposta do tumor para vários tratamentos. Portanto, o estudo de novos marcadores prognósticos no câncer primário do ovário é importante para o planejamento cirúrgico e adjuvante de pacientes, visto que o tratamento desta neoplasia ainda é um desafio para a Oncologia Ginecológica.

Palavras-chave: Neoplasias ovarianas. Citocinas. NO Sintase. Prognóstico. Estadiamento de neoplasias.

ABSTRACT

The objective of this study was to correlate tissue marking by immunohistochemistry of cytokines (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF- α) and iNOS with clinical and pathological parameters of patients with primary ovarian malignancy. As material and methods, were prospectively evaluated 40 patients undergoing surgical treatment for ovarian cysts in accordance with pre-established criteria and with confirmed diagnosis of ovarian cancer. Immunohistochemistry study for cytokines (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF- α) and iNOS was performed. The evaluation of prognostic factors was performed using the Fisher's exact test. The significance level was less than 0.05. As result it was found that the histological grade 1 was significantly correlated with immunohistochemical of intensity (2 and 3) for TNF- α ($p=0.0028$). Also in relation to TNF- α , early stages (I and II, FIGO) were more related to the strong intensity (2 and 3) of immunohistochemical labeling limit breadth of significance ($p=0.0525$). Strong staining immunohistochemical IL5 (2 and 3) was related to disease-free survival less than or equal to 24 months, suggesting that a factor of poor prognosis, but there was no statistical significance ($p = 0.1771$). There was no statistical significance in relation at other cytokines studied and iNOS. The study concluded that the immunohistochemical staining in strong intensity for TNF- α is related to ovarian cancer in histological grade 1 and stages I and II (FIGO). The study of immunology in ovarian cancer may help to better understand the patterns of tumor response to various treatments. Therefore, the study of new prognostic markers in primary cancer of the ovary is important for better planning of surgical and adjuvant treatment of patients since the treatment of this malignancy is still a challenge in Gynecologic Oncology.

Key-words: Ovarian neoplasms. Cytokines. NO synthase. Prognostic. Staging of malignancies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 0 (zero) por imuno-histoquímica de anticorpo policlonal anti-IL6 (400X) 38
- Figura 2 - Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 1 (um) por imuno-histoquímica de anticorpo policlonal anti-IL-10 (400X) 38
- Figura 3 - Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 2 (dois) por imuno-histoquímica de anticorpo policlonal anti-TNF- α (100X) .. 39
- Figura 4 - Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 3 (três) por imuno-histoquímica de anticorpo policlonal anti-TNF- α (100X) ... 39
- Figura 5 - Frequência (%) dos tipos de estadiamento para câncer ovariano segundo a Federação Internacional de Obstetrícia e Ginecologia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Variáveis quantitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012 41
- Tabela 2 - Variáveis qualitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012 42
- Tabela 3 - Tipo histológico dos tumores das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012 44
- Tabela 4 - Distribuição de citocinas com maior intensidade de marcação de acordo com o grau histológico tumoral, estadiamento tumoral, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença ≤ 24 meses 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

AFP: alfafetoproteína

APTS: aminopropiltrietóxi silano

BRCA1: gene supressor de tumor breast cancer 1

BRCA2: gene supressor de tumor breast cancer 2

Ca²⁺: íon cálcio

CA-125: antígeno do câncer ovariano 125

CA-15.3: antígeno do câncer ovariano 15.3

CA-19.9: antígeno do câncer ovariano 19.9

CD: cluster of differentiation

CEA: antígeno carcinoembrionário

DAB: diaminobenzidine

EDRF: fator de relaxamento derivado do endotélio

FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetricia

GM-CSF: fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos

IFN- γ : interferon gama

IL: interleucina

IL-1: interleucina 1

IL-2: interleucina 2

IL-5: interleucina 5

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IL-10: interleucina 10

IL-11: interleucina 11

IL-12: interleucina 12

IL-16: interleucina 16

IL-18: interleucina 18

IOTA: Internacinal Ovarian Tumor Analysis

IPON: Instituto de Pesquisa em Oncologia

kD: quilodaltons

LPS: lipopolissacarpideo

LR1: Regressão lpgística 1
LR2: Regressão lpgística 2
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
NK: linfócito natural killer
NKT: linfócito T natural killer
NO: óxido nítrico
NOS: sintase de óxido nítrico
NOSc: sintase de óxido nítrico constitutiva
NOSe: sintase de óxido nítrico endotelial
NOSi: sintase de óxido nítrico induzida
NOSn: sintase de óxido nítrico neural
OMS: Organização Mundial da Saúde
p53: proteína citoplasmática 53
PBS: phosphate buffered saline (salina tamponada com fosfato)
pH: potencial de hidrogênio
RNA: ácido ribonucleico
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
sIL-2: receptor solúvel de interleucina 2
sTNF-R: forma solúvel de receptores de membrana para TNF
TAL: linfócitos associados ao tumor
TAM: células mononucleares associadas ao tumor
TGF: fator de transformação do crescimento
TGF- β 1: fator de transformação do crescimento beta 1
TIL: linfócitos infiltrantes ao tumor
TNF: fator de necrose tecidual
TNF-R: receptores de superfície de membrana para TNF
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
Treg: células T reguladoras
Tris-EDTA: trizma-ácido etilenodiaminotetracético
UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	NEOPLASIA MALIGNA DE OVÁRIO	16
1.1.1	Fatores Prognósticos no Câncer de Ovário	20
1.2	PROGRESSÃO NATURAL DO CÂNCER DE OVÁRIO	20
1.3	O SISTEMA IMUNE NO CÂNCER DE OVÁRIO	23
1.3.1	Linfócitos T CD3+	24
1.3.2	Linfócitos T Natural Killer (NKT)	24
1.3.3	Linfócitos Natural Killer (NK)	25
1.3.4	Macrofagos	25
1.4	CITOCINAS	26
1.4.1	Citocinas de padrão TH1	27
1.4.1.1	<i>INTERLEUCINA 2 (IL-2)</i>	28
1.4.1.2	<i>INTERLEUCINA 8 (IL-8)</i>	28
1.4.1.3	<i>FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-α)</i>	28
1.4.2	Citocinas de padrão TH2	28
1.4.2.1	<i>INTERLEUCINA 5 (IL-5)</i>	28
1.4.2.2	<i>INTERLEUCINA 6 (IL-6)</i>	29
1.4.2.3	<i>INTERLEUCINA 10 (IL-10)</i>	29
1.5	ÓXIDO NÍTRICO – ASPECTOS GERAIS	30
2	HIPÓTESE	32
3	OBJETIVO	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS	34
4.1.1	Pacientes	34
4.1.2	Critérios de inclusão	35
4.1.3	Critérios de exclusão	35
4.2	MÉTODOS	35
4.2.1	Modelo de estudo	35
4.2.2	Anátomo-patológico	35
4.2.3	Imuno-histoquímica	36
4.2.4	Banco de dados	40

4.2.5	Análise estatística	40
4.2.6	Redação do texto	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO E ESCLARECIMENTO	64
	APÊNDICE B – CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES	
	OVARIANOS SEGUNDO A OMS	65
	APÊNDICE C – ESTADIAMENTO DAS NEOPLASIAS MALIGNAS DE	
	OVÁRIO (FIGO)	70
	APÊNDICE D – TAMPÕES E REAGENTES UTILIZADOS EM IMUNO-	
	HISTOQUÍMICA	71
	ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM	
	PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO	
	MINEIRO	72

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e que podem invadir os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno é caracterizado por uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (INCA, 2013)

1.1 NEOPLASIA MALIGNA DE OVÁRIO

A questão do câncer de ovário é um grande desafio para oncologistas ginecológicos. Apesar de uma vasta quantidade de pesquisa clínica e laboratorial, melhoria nas técnicas cirúrgicas e um arsenal cada vez maior de agentes quimioterápicos, o câncer de ovário ainda permanece sendo a malignidade ginecológica mais letal e uma das principais causas de morbidade para a maioria daquelas que sofrem com a doença (MARSDEN et al., 2000). Como a maioria das pacientes é assintomática até que a doença apresente metástase, dois terços são diagnosticados em estágio avançado (HOLSCHNEIDER et al., 2000). Cerca de 5 a 10% dos tumores em estadiamento aparentemente inicial já apresentam metástases em linfonodos aórticos ou pélvicos (RUBIN, 1992, MURTA et al., 1995).

O primeiro relatório de câncer de ovário foi feito por Von Grafenberg em 1586 e a ooforectomia tornou-se prática aceita somente no final do século XIX (CIANFRANI, 1960). Atualmente, a frequência de câncer de ovário apresenta um número bem mais elevado quando comparado aos relatos de casos registrados pelos cirurgiões que realizam ooforectomias há cerca de três décadas (WOODRUFF, 1979).

As mudanças no número de casos parecem não ser atribuídas a uma melhor compreensão da doença, na melhoria das técnicas de diagnóstico, ou no envelhecimento da população. As razões não são claras, mas é possível que o ambiente ou fatores sociais, tais como a diminuição do tamanho da família, menarca precoce, menopausa tardia e idade

avançada desempenhem um papel importante (DALY et al., 1998; MARSDEN et al., 2000), mostrando que a etiologia do câncer de ovário parece ser multifatorial, em que inclui fatores reprodutivos, familiares e pessoais (REIS, 2004). Existem evidências consistentes a respeito do efeito protetor da multiparidade (TITUS-ERNSTOFF et al., 2001) e do uso de contraceptivos orais (KURIAN et al., 2005). Cerca de 90% dos cânceres de ovário são esporádicos, isto é, não apresentam fator de risco reconhecido. Cerca de 10% apresentam um componente genético ou familiar. A história de câncer de ovário ou câncer de mama em parente de primeiro grau é considerada o principal fator de risco, embora apenas 5% das mulheres com doença apresentem fatores genéticos identificáveis (CANNISTRA, 2004). As mulheres que possuem mutações deletérias nos genes BRCA1 ou BRCA2 representam o subgrupo com maior risco de apresentar câncer de ovário. 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 de 50 anos de idade (SGO, 2005; SCHMELER et al., 2006). Tanto BRCA1 como BRCA2 são genes supressores de tumores que são herdados de maneira autossômica dominante (CHOBANIAN et al., 2008). História familiar é o fator de risco isolado mais importante (INCA, 2012)

Cerca de 22.440 novos casos são estimados para os Estados Unidos da América em 2013 e com uma estimativa de 14.030 mortes. O câncer de ovário é responsável por cerca de 3% de todos os cânceres entre as mulheres e sua incidência tem diminuído em 1,0% por ano desde 1992 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). O câncer de ovário é a quinta neoplasia maligna mais comum entre as mulheres e é a quinta principal causa de mortalidade (MARSDEN et al., 2000; HOLSCHNEIDER et al., 2000), mais mulheres morrem de câncer de ovário do que de todos os outros tumores ginecológicos juntos (HOLSCHNEIDER et al., 2000). O risco de uma mulher de um país ocidental vir a desenvolver uma neoplasia ovariana é de cerca de 1:70 (MARSDEN et al., 2000) e o pico de incidência da doença está no início da sexta década de vida e a taxa de mortalidade em mulheres idosas é maior em comparação com mulheres mais jovens (OMURA et al., 1991).

A sensibilidade e a especificidade do exame ginecológico para o rastreamento de neoplasias ovarianas são questionáveis (MURTA et al., 2004; PADILLA et al., 2005). A ultrassonografia pode ajudar no diagnóstico de tumores ovarianos e na diferenciação entre tumores neoplásicos e não neoplásicos (MINARETZIS et al., 1994, OSMERS et al., 1998),

além de fornecer informações importantes, tais como o tamanho e conteúdo destes tumores e pode ser usada para diferenciá-los entre malignos e benignos (NARASIMHAN, 2008). A ultrassonografia transvaginal associada com a imagem colorida com Doppler pode aumentar a sua especificidade (GUERRIERO et al., 2005; SZPUREK et al., 2005), possibilitando a avaliação da condição vascular do tumor e o fluxo sanguíneo (RIVOIRE, 2006). Porém, o diagnóstico precoce de câncer ovariano pela ultrassonografia ainda é controverso devido à sua baixa prevalência na população geral (FISHMAN et al., 2005) e também por ocorrerem falhas na detecção de tumores em estágio inicial (OLIVIER et al., 2006), dificultando o seu rastreamento.

Os marcadores tumorais podem ser úteis no manejo de massas anexiais. Os marcadores CA-15.3, CA-125, CA-19.9 e CEA apresentam alta positividade tanto no soro quanto no fluido intracístico de pacientes com tumores epiteliais malignos (CHERCHI et al., 2002; TAVARES-MURTA et al., 2004). A associação de ultrassonografia e marcadores tumorais pode melhorar a sensibilidade e a especificidade como fator preditivo de malignidade nas neoplasias ovarianas (MURTA et al., 2004).

A principal estratégia terapêutica é a cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia. Apesar dos esquemas quimioterápicos derivados do platínio e dos taxanos, a sobrevida em 5 anos nos estadiamentos III e IV é de apenas 5 a 15%, enquanto que nos estádios I e II varia de 80 a 95% (DORUM et al., 1996; YAWN et al., 2001). A sobrevida das pacientes está correlacionada com o estadiamento da doença na época do diagnóstico e com a doença residual após a primeira cirurgia (ZANNETA, et al., 1998). A diferenciação dos processos expansivos ovarianos em benignos e malignos é crucial para que o clínico possa selecionar e aperfeiçoar o tratamento (MAYER et al., 1992; KEHOE et al., 1994). A taxa de sobrevida geral, em 5 anos, é de 50%, com 95% de sobrevida para paciente com neoplasia restrita aos ovários (estadiamento I), 79% naquelas com doença infiltrada em tecidos adjacentes aos ovários (estadiamento II) e de 28% naquelas com estágio clínico avançado (estadiamento IV) (SMITH, 2001). A caracterização correta de tumores ovarianos antes da cirurgia é de suma importância para aperfeiçoar o atendimento ao paciente, o protocolo cirúrgico e, portanto, a sobrevivência da paciente (VERGOTE et al., 2001; EARLE et al., 2006).

Muitos modelos de previsão têm sido desenvolvidos para ajudar a caracterizar as massas ovarianas (TAILOR et al., 1999; GEOMINI et al., 2009). Um destes modelos é o Iternacional Ovarian Tumor Analysis (IOTA), grupo formado em 1999 por Dirk Timmerman,

Lil Valentin e Tom Bourne. Seu primeiro objetivo era desenvolver uma terminologia padronizada sobre os termos, definições e medidas para descrever os aspectos ultrassonográficos baseados nos modelos de análise de regressão logística (por exemplo, LR1 e LR2) das massas anexiais (IOTA, 2013), compreendendo um conjunto de estudos que estimam o risco de malignidade, bem como um conjunto de regras simples baseadas em ultrassom, que caracterizam as massas como benignas, malignas ou inconclusivas (TIMMERMAN et al., 2010; VAN HOLSBEKE et al., 2012; KAIJSER et al., 2013).

Os modelos de regressão logísticas adotados pelo IOTA adotavam 18 tipos de variáveis, sendo o LR1 incluindo 12 dessas variáveis e o LR2 incluindo 6. As 12 variáveis utilizadas na LR1 foram: (1) a história pessoal de câncer de ovário, (2) uso de terapia hormonal, (3) a idade da paciente, (4) de diâmetro máximo da lesão; (5) dor durante o exame; (6) ascite, (7) fluxo de sangue dentro de uma projeção papilar sólida, (8) tumor totalmente sólido, (9) o diâmetro máximo do componente sólido, (10) presença de paredes internas irregulares no cisto, (11) sombras acústicas e (12) pontuação de cor. As seis variáveis utilizadas na LR2 foram: (1) a idade, (2) ascite, (3) o fluxo de sangue dentro de uma projeção papilar sólida, (4) o diâmetro máximo do componente sólido, (5) presença de paredes internas irregulares no cisto e (6) sombras acústicas (KAIJSER et al., 2013). Embora o desempenho dos modelos do IOTA se aproxima de nível de avaliação subjetiva, a melhor abordagem para a classificação de doenças anexiais permanece ainda como a avaliação subjetiva dos resultados de ultrassom por examinadores experientes (Timmerman et al., 1999; Timmerman et al., 2004).

O IOTA é amplamente usado hoje em diversos centros distribuídos pelo mundo coordenados a partir do centro da Universidade de Leuven na Bélgica. Atualmente o IOTA está envolvido em vários novos estudos, divididos em 5 fases. Hoje, existem mais de 50 unidades clínicas que contribuem para os estudos IOTA em quase todos os continentes. (IOTA, 2013).

Há uma necessidade importante do desenvolvimento de novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do câncer de ovário, que podem também, idealmente, servir como alvos de novas modalidades terapêuticas (ATHANASSIADOU et al., 2008).

1.1.1 Fatores Prognósticos no Câncer de Ovário

O câncer de ovário é a principal causa de morte entre as neoplasias ginecológicas. A sobrevida global é apenas 30–40% em cinco anos. Isto ocorre em parte porque a maioria das pacientes tem a doença diagnosticada em estádios avançados, situação em que as opções de tratamento são restritas a cirurgia citorrredutora e a quimioterapia baseada nos derivados da platina. Estas modalidades terapêuticas são apenas parcialmente efetivas e, conseqüentemente, a maioria das pacientes apresentará recorrência e óbito em função da doença (REIS, 2004).

Os fatores de prognóstico, definidos pela correlação com a sobrevida, em geral refletem a extensão da doença (estádio), a biologia intrínseca do tumor (tipo e grau histológico) e a capacidade da paciente em tolerar o tratamento para a doença. Assim como estes fatores pré-tratamento, outros que podem ter impacto na sobrevida incluem o tipo de tratamento recebido (citorredução ótima, quimioterapia baseada em derivados da platina) e o efeito da terapêutica sobre o tumor (ex. resposta completa) ou sobre a paciente (ex. mielossupressão) (AGARWAL et al., 2005). Entre estes fatores de prognóstico, o estadiamento da FIGO é considerado o mais importante (REIS, 2004). O estádio do tumor, doença residual após a cirurgia, o tipo histológico inicial e o grau do tumor são os mais importantes fatores prognósticos relacionados com a evolução da paciente (GADDUCCI et al., 2009).

Nos últimos anos, várias investigações avaliaram a relevância clínica de diferentes variáveis biológicas, avaliando desde amostras de tecido ou de soro de pacientes com câncer epitelial de ovário, a fim de detectar os biomarcadores capazes de prever tanto a resposta à quimioterapia ou a sobrevivência dessas pacientes. Os estudos sobre o papel de marcadores moleculares individuais demonstraram que a carcinogênese ovariana é um processo complexo, multifatorial associado com anormalidades em várias famílias de genes, que poderia ter uma relevância preditiva ou prognóstica (GADDUCCI et al., 2009).

1.2 PROGRESSÃO NATURAL DO CÂNCER DE OVÁRIO

Dados demonstram que o câncer de ovário não apresenta uma lesão pré-invasiva bem definida, fato que dificulta o estabelecimento de estratégias de prevenção dessa doença (RICCI et al., 2008). As neoplasias malignas ovarianas epiteliais se originam da superfície

endotelial do mesotélio celômico embrionário. Os tumores iniciam seu desenvolvimento como um cisto dentro da cápsula do ovário (PIVER et al., 1978; RUBIN et al., 1992; MURTA et al., 1995), sendo este definido como uma entidade não invasiva que hospeda anormalidades genéticas (RICCI et al., 2008). Esses tumores crescem por um período de tempo desconhecido antes da capacidade de formação de metástases (PIVER et al., 1978; RUBIN et al., 1992; MURTA et al., 1995).

As opiniões sobre a origem do câncer epitelial de ovário são controversas, embora pesquisadores apontem as células superficiais do córtex ovariano como as responsáveis pelo início da carcinogênese (BREWER et al., 2003). Muitos cânceres de ovário se originam a partir de células dispostas nos cistos de inclusão localizados no epitélio superficial do córtex ovariano (SCULLY, 1995). Esses cistos de inclusão superficiais surgem após a ovulação, sugerindo que o epitélio superficial do ovário, provavelmente, seja o precursor da maioria dos cânceres do órgão (RICCI et al., 2008).

As células superficiais do epitélio ovariano usufruem intimamente do contato dos esteróides sexuais produzidos pelo ovário (BREWER et al., 2003). O reparo crônico após cada ovulação associado à influência dos hormônios ovarianos, aumentaria a propensão dessas células sofrerem processo de carcinogênese (RICCI et al., 2008).

Embora a associação entre ovulação e o câncer ovariano seja bem aceita, o conhecimento sobre o seu mecanismo biológico ainda é incerto. A ovulação é um fator importante no desenvolvimento de cistos de inclusão e quando associada à alta taxa de estrógeno pode contribuir para a proliferação de células epiteliais na superfície ovariana (RICCI et al., 2008). Essas células, geralmente, são quiescentes, mas proliferam após a ovulação na tentativa de reparar o defeito criado pela liberação do oócito maduro (BREWER et al., 2003). Essa proliferação pode contribuir para o acúmulo de defeitos genéticos nas células epiteliais da superfície ovariana e ainda somada a fatores de crescimento e citocinas produzidos durante o reparo da área lesada levam a uma maior sobrevivência das células epiteliais com acúmulo de mutações (MURDOCH & MCSONNEL, 2002; RICCI et al., 2008).

A relação entre o aumento da ovulação e o aumento do risco de câncer ovariano baseia-se em dados que demonstram forte correlação entre o número de ovulações e frequência de mutações do p53, um gene supressor tumoral que regula o crescimento celular (CASEY et al., 2000). O uso de anticoncepcional desempenha um fator protetor considerável,

visto que, com o uso tal contraceptivo há uma diminuição no número de ovulações, protegendo o ovário dos danos causados por ela.

Foi demonstrado por alguns autores que a proliferação celular epitelial e a transformação maligna dentro de invaginações epiteliais e cistos de inclusão podem ocorrer como resultado da exposição ao fluido folicular rico em estrógeno durante a ovulação, indicando que os estrógenos e progesterona desempenham um papel importante na proliferação celular no carcinoma de ovário (CASAGRANDE et al., 1979; ORTH et al., 1994; BECHT & BONAVIDA, 2001).

Por outro lado, recentes estudos genéticos morfológicos e moleculares levaram a uma mudança de conceito em relação à carcinogênese e histogênese dos carcinomas serosos pélvicos não uterinos. Carcinomas serosos pélvicos que tradicionalmente são classificados como de origem ovariana podem, na verdade, se originar a partir da porção distal da tuba uterina. Expansões clonais da célula secretora tubária provavelmente originariam esses carcinomas. Portanto, a concepção clássica da patogenia do câncer de ovário baseada no papel do epitélio ovariano é atualmente reconsiderada e uma nova hipótese é formulada, o que apoia o envolvimento direto das tubas uterinas no tipo seroso (LILIAC et al., 2012; LI et al., 2012).

O padrão de disseminação do câncer de ovário ocorre de várias formas (BHOOLA & HOSKINS, 2006). O tumor invade a cápsula do ovário e, por contiguidade, acomete órgãos adjacentes, como útero, tuba uterina, bexiga e peritônio pélvico. Além disso, as células tumorais atingem o sistema linfático, ocasionando o aparecimento de metástases em linfonodos das cadeias ilíaca externa, ilíaca comum, hipogástrica, sacral lateral e aórtica, podendo haver o envolvimento de linfonodos inguiniais (WU et al., 1986; RICCI et. al., 2008). A disseminação hematogênica é menos frequente e ocorre principalmente no parênquima hepático, cérebro e pulmões (DEUTSCH et al., 1987; LEROUX et al., 1991; CORMIO et. al., 2003). Finalmente, células que se descamam da superfície do tumor que são levadas pelo mecanismo de peristaltismo intestinal e reflexo gastroenterocólico e implantam-se na superfície serosa do omento, peritônio, diafragma, fígado e demais vísceras abdominais (RICCI et. al., 2008). Além disso, podem passar através dos canais linfáticos do diafragma, chegando à cavidade pleural. A forma de disseminação por esfoliação é uma das vias mais importantes da disseminação tumoral (FELDMAN & KNAPP, 1974).

1.3 O SISTEMA IMUNE NO CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário configura um dos grandes desafios à medicina. Estima-se que 22.440 novos casos de câncer de ovário são esperados em 2013 para os Estados Unidos, sendo responsável por cerca de 3% de todos os cânceres entre as mulheres. A sua incidência tem diminuído em 1% por ano desde 1992. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

O diagnóstico do câncer de ovariano, porém, é grandemente afetado pela ausência de sinais e sintomas específicos, bem como de biomarcadores confiáveis e pela própria localização anatômica ovariana. Em virtude disso, é frequentemente diagnosticado em estádios tardios, quando o prognóstico da doença é sombrio (DALTOÉ et al., 2010).

Devido o câncer de ovário ser frequentemente diagnosticado em estádios avançados, os fatores prognósticos estabelecidos para a doença, tal como o estágio, doença residual após cirurgia inicial, tipo histológico e grau tumoral, têm limitado valor. Dessa forma, alternativas tem surgido para tentar descobrir métodos que melhoram o prognóstico da doença e oriente melhor a escolha da conduta terapêutica a ser tomada (BAMIAS et al., 2007).

Trabalhos recentes demonstram a significância prognóstica dos elementos da resposta imune frente aos cânceres ovarianos. A presença de algumas populações de leucócitos infiltrando ou associadas ao tumor foi correlacionada com melhor prognóstico da doença, enquanto a presença de outras foi associada ao seu pior prognóstico, indicando o papel protetor e, ao mesmo tempo, promotor do sistema imune sobre o câncer (ZHANG et al., 2003; CURRIEL et al., 2004; SATO et al., 2005; HAGEMANN et al., 2006).

Estudos realizados em vários tecidos tumorais demonstram que há uma forte infiltração de leucócitos intra-tumoral e nas adjacências dos tumores. Nos cânceres, a presença destas células está relacionada à resposta ao tumor, em decorrência de processos inflamatórios pré-câncer ou por substâncias produzidas pelas próprias células tumorais (VAKKILA et al., 2004).

No câncer ovariano, algumas subpopulações de leucócitos têm sido relacionadas com melhor prognóstico, enquanto outras com prognóstico ruim. A presença dessas células imunes infiltrantes no tumor permite uma melhor predição no resultado clínico do que outros parâmetros histopatológicos usados, indicando que o perfil imunológico pode ser útil na condução de formas alternativas de tratamento, tal como a imunoterapia (GALON et al., 2006; DALTOÉ et al., 2010).

1.3.1 Linfócitos T CD3+

Existem subpopulações entre os linfócitos T. Entre elas estão os linfócitos T *helper* ou auxiliares (CD3+ CD4+) e os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos (CD3+ CD8+). Os primeiros estimulam o crescimento e diferenciação de linfócitos B e ativam macrófagos pela secreção de citocinas. Já os últimos lizam as células infectadas por vírus e as tumorais (ABBAS et al., 2004).

Os linfócitos T CD3+ representam a maior população leucocitária detectada em tumores ovarianos. Além de infiltrarem o tumor (TIL - Linfócitos Infiltrantes ao Tumor) são encontrados também no líquido ascítico (TAL – Linfócitos Associados ao Tumor). A presença dos linfócitos infiltrantes está relacionada com uma maior taxa de sobrevida em pacientes com diagnóstico de câncer ovariano em estádios III e IV comparados com aquelas pacientes em que não apresentavam tais linfócitos. Além desses dados, a citorredução ótima também foi observada na maioria das pacientes que apresentavam tais células (ZANG et al., 2003).

Em comparação com neoplasias epiteliais benignas do ovário, os carcinomas apresentam significativamente maior nível de células T CD3+ CD8+, sugerindo que a presença desses linfócitos está relacionada a um melhor prognóstico à resposta clínica do câncer ovariano (HELAL et al., 2004).

Apesar do papel protetor sugerido pelos linfócitos T, uma população, a de linfócitos T CD3+ CD4+ CD25+, tem sido relacionada a prognóstico ruim do câncer ovariano. Denominadas células T reguladoras (Treg), têm importante papel na manutenção da tolerância imunológica aos antígenos próprios, através da supressão das funções de ativação e efetoras dos linfócitos T auto reativos maduros (ABBAS et al., 2004). Entretanto, as células Treg podem bloquear os efeitos protetores dos linfócitos T tumor-específicos em pacientes com câncer ovariano e suprimir a produção de INF- γ e interleucina 2 (IL-2) pelos linfócitos T. A alta taxa de células Treg foi apontada como preditora de risco de morte e reduzindo a sobrevida em pacientes com câncer de ovário, em todos os estádios (CURRIEL et al., 2004).

1.3.2 Linfócitos T *Natural Killer* (NKT)

As células T natural killer (NKT) são linfócitos T que apresentam receptores para células NK e para linfócitos T. No câncer de ovário, assim como em melanoma, câncer de

mama, pâncreas, pulmão e colorretal, as células NKT foram associadas à inibição do crescimento tumoral, através de lise das células tumorais (LAMKIN et al., 2008).

O nível de células NKT, no câncer ovariano, é significativamente maior no tumor e na ascite do que no sangue periférico. A presença de NKT na ascite está associada à resistência ao tratamento quimioterápico com derivados de platina. Assim sendo, o grande número de células NKT na ascite pode ser um preditor de sensibilidade à platina (BAMIAS et al., 2007).

1.3.3 Linfócitos *Natural Killer* (NK)

Esses linfócitos não apresentam marcadores para linfócitos T e nem B. As células NK são capazes de destruir células que tem expressão reduzida de moléculas do MHC de classe I, que conseguem escapar da destruição pelos linfócitos T citotóxicos (ABBAS et al., 2004).

O número de células NK encontradas no sangue periférico de pacientes diagnosticadas com câncer de ovário em estádios avançados foi significativamente maior que no tumor e na ascite (SANTIN et al., 2001). O número aumentado de células NK na ascite foi relacionado à pior resultado clínico do câncer ovariano, com diminuição da sobrevida (SHI et al., 2006).

A presença do marcador CA125 inibe a função de lise das células NK, podendo reduzir em até 70% da sua capacidade citolítica. O CA125 liga-se às células NK, em especial a uma subpopulação destas, as células NK CD16+ CD56+. Estas representam a maioria das células NK presentes no sangue periférico, cerca de 90% (BELISLE et al., 2007).

1.3.4 Macrófagos

Os macrófagos são membros do sistema fagocitário mononuclear. Entre suas funções estão à fagocitose de partículas estranhas, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a apresentação de antígenos para os linfócitos T (ABBAS et al., 2004). Os macrófagos tumor-associados (TAM) são capazes de afetar diversos aspectos dos tecidos neoplásicos, tais como, vascularização, taxa de crescimento, formação e dissolução do estroma (MANTOVANI et al., 1992).

Os macrófagos constituem cerca de 51% da população de células mononucleares infiltradas nos carcinomas de ovário, tendo sido observados em todos os tumores malignos. Já nos tumores benignos a presença dessas células foi detectada em 57% dos tumores. O número

médio de macrófagos foi significativamente maior nos carcinomas quando comparados aos tumores benignos (HELAL et al., 2004).

1.4 CITOCINAS

As citocinas são uma variedade de peptídeos e glicoproteínas de baixo peso molecular (menor que 80 kD) que atuam na intercomunicação celular (HAMBLIN, 1993), regulando as funções de proliferação, diferenciação e morte celular programada, apoptose (FLORES et al., 2001). Podem ser secretadas e/ou expressas em membranas celulares ou armazenadas na matriz extracelular (HAMBLIN, 1993).

Um dos aspectos mais importantes dessas proteínas são o amplo espectro e o potencial de ações. Podendo ser produzidas por qualquer célula do corpo com exceção dos eritrócitos. São importantes na estimulação e supressão dos eventos da resposta imune, desencadeando e coordenando a resposta inflamatória (HAMBLIN, 1993) por serem determinantes na regulação da função, crescimento e diferenciação celular desse sistema, apresentando funções-chave na defesa do hospedeiro (NEGUS et al., 1997).

As citocinas são também chamadas de citoquinas, linfocinas (devido à maioria das citocinas da imunidade específica serem produzidas por linfócitos T ativados), monocinas (por serem produzidas principalmente por fagócitos mononucleares na imunidade natural), imunotransmissores, imunocitocinas (por serem produzidas em grande parte pelo sistema imune), quimiocinas (por algumas citocinas compartilharem a capacidade de estimular o movimento leucocitário, quimiotaxia, e o movimento dirigido, quimiotaxia) e interleucinas (uma hipótese importante gerada na década de 70 foi que as citocinas eram sintetizadas principalmente por leucócitos e primariamente atuavam sobre outros leucócitos e, desta forma, poderiam ser chamadas interleucinas (IL) (ABBAS et al., 2004).

As citocinas desempenham papel fundamental na regulação dos processos biológicos, tais como: no crescimento e ativação celular, quimiotaxia, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e na morfogênese. A resposta imune pode ser avaliada de acordo com o perfil de citocinas secretadas pelos linfócitos CD4+. Assim, na resposta imune do tipo TH1 estão envolvidas as citocinas IL-2, IL-8, TNF- α e na do tipo TH2 há secreção de IL-5, IL-6 e IL-10. As células TH1 participam das reações de citotoxicidade, inflamação e estão envolvidas na defesa do hospedeiro contra doenças virais, microbianas e neoplásicas. As células TH2 atuam

principalmente na resposta imune humoral, produzindo anticorpos em reações atópicas e para a defesa do hospedeiro contra doenças parasitárias (BECKER et al., 2003).

Grande quantidade de leucócitos, principalmente macrófagos e linfócitos, os TAMs, podem ser encontrados no estroma tumoral (NEGUS et al., 1997) e em efusões neoplásicas (MANTOVANI, 1997), sendo capazes de produzir citocinas tipo TH1 e TH2. Um progressivo desvio no comportamento das TAMs no perfil de produção de TH1 a TH2 pode ocorrer durante a progressão tumoral, o que reduziria a resposta imune ao tumor (MANTOVANI et al., 1997), indicando que as citocinas são importantes no estudo da interação tumor-hospedeiro possuindo propriedades pró ou antitumorais (PRIES & WOLLENBERG, 2006).

Recentemente, a contribuição das citocinas tem sido demonstrada para o câncer. As citocinas podem estimular o crescimento celular e contribuir para a metástase. Se permanentemente sintetizadas, estas substâncias podem ser utilizadas como marcadores de ativação do sistema imune. A participação das citocinas na oncogênese revela suas atuações (isolada ou em conjunto com outras citocinas) em atividades imunomoduladoras da resposta imunológica contra neoplasias e, conseqüentemente, na sinalização entre células inflamatórias e o tecido neoplásico invasivo. Essa sinalização poderia inferir ou não em vantagens seletivas ao crescimento das células malignas (STEIN & DALGLEISH, 1994; PRIES & WOLLENBERG, 2006).

Existem diferenças no microambiente tumoral na quantidade de citocinas expressadas entre neoplasias benignas, malignas e tumores não neoplásicos, sugerindo um papel significativo das citocinas na progressão tumoral (TAVARES-MURTA et al., 2004).

1.4.1 Citocinas de padrão TH1

A resposta imunológica do tipo TH1 é caracterizada pela produção de citocinas, tais como IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α . Há ativação dos macrófagos e da fagocitose, e dos mecanismos citotóxicos, levando a extensa destruição das zonas infectadas. É eficaz na eliminação dos agentes patogênicos intracelulares. Neste trabalho iremos abordar algumas dessas citocinas como a IL-2, a IL-8 e o TNF- α .

1.4.1.1 INTERLEUCINA 2 (IL-2)

A IL-2 atua na promoção do crescimento e maturação dos linfócitos T e B. Secretada pelas células T CD4+ ativadas, participa também da ativação, crescimento e estímulo da função tumoricida das células Natural Killer (NK) (GRIMM et al, 1983).

1.4.1.2 INTERLEUCINA 8 (IL-8)

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, originalmente identificada como quimioatrativa de neutrófilos (BENOY et al., 2004). Sua expressão em células do melanoma humano e do câncer ovariano está correlacionada ao potencial metastático do tumor (XU & FIDLER, 2000; HUANG et al, 2002; AGGARWAL et al, 2006). É produzida por macrófagos, monócitos e linfócitos e pode exercer vários efeitos sobre o sistema imune e está relacionadas a angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas (KOZLOWSKI et al., 2003).

1.4.1.3 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α)

O TNF- α , além de ser um dos principais mediadores da inflamação, também é produzido por tumores. Seu papel na tumorigênese inclui transformação e proliferação celular na invasão, angiogênese e metástase (BALKWILL, 2002; MANTOVANI, 2005).

1.4.2 Citocinas de padrão TH2

Na resposta imunológica do tipo TH2 há secreção de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Esta resposta é caracterizada pelo estímulo da produção de anticorpos pelos linfócitos B. É eficaz contra organismos que circulem no sangue, como bactérias extracelulares e parasitas. Neste trabalho iremos abordar algumas dessas citocinas como a IL-5, a IL-6 e IL-10.

1.4.2.1 INTERLEUCINA 5 (IL-5)

A IL-5 é uma interleucina produzida por células T e mastócitos. Suas funções são estimular a produção de células B e aumentar a secreção de imunoglobulinas. Também

desempenha um papel essencial na ativação de eosinófilos. É uma citocina que faz parte da família hematopoiética (MILBURN et al., 1993).

1.4.2.2 INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A IL-6 influencia a função ovariana e no processo de ovulação, fertilização e implantação (DESPHANDE et al, 2000). Pode estar associada à progressão tumoral através da apoptose de células malignas (TABIBZADEH, 1989). Elevadas concentrações de IL-6 podem ser encontradas em neoplasias malignas renais, colorretais, ovário, mama, endométrio e pulmões. Em neoplasias malignas de ovário a IL-6 é relatada como fator prognóstico da doença (AKAHIRO et al, 2004), assim como um fator prognóstico na identificação de tumores resistentes à quimioterapia (BELLONE et al., 2005).

Níveis séricos de IL-6, IL-8 e IL-18 podem se correlacionar ao pior prognóstico no câncer de ovário e com a sobrevida global (SCAMBIA et al., 1995; KASSIM et al., 2004; AKAHIRO et al., 2004).

1.4.2.3 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina multifuncional produzida pelos linfócitos TH2, e pode inibir a resposta imune do tipo celular e as funções das células TH1 (CD4+) imunocompetentes pelo bloqueio da função de apresentação de antígenos por estas células (LLANES-FERNANDEZ et al., 2009), as quais são capazes de produzir IL-8, acarretando a progressão da malignidade tumoral (KOZLOWSKI et al., 2003; VURAL et al, 2010). É produzida por macrófagos, monócitos e linfócitos. A IL-10 é um inibidor de macrófagos ativados, o que lhe cabe um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata e da imunidade celular. Tem a função de inibir a produção de IL-12 e TNF pelos macrófagos ativados, inibir a expressão de co-estimuladores e de moléculas do MHC de classe II nos macrófagos, e estimular a proliferação de células B em culturas (ABBAS et al., 2004).

A IL-10 podem exercer vários efeitos sobre o sistema imune e está relacionada à angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas juntamente com a IL-8 (KOZLOWSKI et al., 2003).

1.5 ÓXIDO NÍTRICO – ASPECTOS GERAIS

Em 1987 identificado como um mensageiro biológico, o óxido nítrico (NO) é considerado como sendo uma das menores moléculas existentes e a sua descoberta causou um grande aumento nas investigações científicas com o intuito de tentar decifrar as suas atividades fisiológicas e a sua participação nas doenças (XU et al., 2002).

O NO é gerado por uma família de isoenzimas, a sintase de Óxido Nítrico (NOS), através da catálise enzimática do aminoácido essencial L-arginina, que resulta na formação de L-citrulina e NO (MONCADA et al., 1991). Existem três isoformas de NOS, na qual, duas são constitutivas (NOSc) e uma é induzida (NOSi) (XU et al., 2002). As isoformas constitutivas (NOSc) são a NOS neural (NOSn/NOS1) e a NOS endotelial (NOSe/NOS3) (ALDERTON et al., 2001; MICHEL et al., 1997), constitutivamente expressa em alguns tipos de células, principalmente neurônios e células endoteliais, respectivamente (MOCELLIN et al., 2007). A NOSc é citoplasmática e dependente de Ca^{2+} /calmodulina, produzindo NO em pequenas concentrações e por curtos períodos de tempo em resposta à estimulação física ou de receptores (MONCADA et al., 1991). A outra isoformas, a induzida (NOSi/NOS2), é citoplasmática e Ca^{2+} independente, é produzida em macrófagos, células endoteliais e outros tipos celulares após estimulação por lipopolissacarídeos (LPS) e/ou citocinas como IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF), principalmente do tipo alfa (TNF- α) e interleucinas e sob essas condições, o NO gerado, tem a sua liberação prolongada e é produzido em maiores concentrações (MONCADA et al., 1991; DACHS et al., 2000; KLEINERT et al., 2003). O aumento da NOSi está relacionado com alguns tipos de carcinomas (BULUT et al., 2005; ÖZEL et al., 2006).

Inicialmente descrito como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (PALMER et al., 1987), o NO é um radical livre atuando como um mensageiro gasoso que afeta várias funções biológicas. Em baixas concentrações atua como um transdutor de sinal em muitos processos fisiológicos (por exemplo, a regulação do fluxo sanguíneo, homeostase de ferro, a reatividade plaquetária, neurotransmissão e modulação da resposta imune mediada por células) e em altas concentrações, como um mecanismo de defesa contra patógenos citotóxicos, e tumores (IGNARRO et al., 2000). Estudos indicam que o NO e os radicais derivados do metabolismo do oxigênio como os superóxidos são moléculas-chave na patogênese de várias doenças infecciosas (AKAIKE et al., 2000). Além disso, evidências acumuladas sugerem que níveis cronicamente elevados de NO estão envolvidos na patogênese

de algumas condições patológicas humanas, tais como a doença inflamatória intestinal (SHAH et al., 2004), doenças neurodegenerativas (ISCHIROPOULOS et al, 2003) e câncer (LALA et al., 2001; XU et al., 2002). Neste contexto pode-se demonstrar que o aumento da produção de NO está diretamente ligado ao aumento da regulação da NOSi.

Vários pesquisadores relataram a expressão de NOSi por células malignas ou no microambiente do tumor, tanto em nível de mRNA e proteína (MOCELLIN et al, 2007), sendo sua marcação imuno-histoquímica mais intensa em neoplasias malignas comparadas com neoplasias benignas (NOMELINI et al, 2009). No câncer de ovário, a atividade da NOSi foi localizada nas células tumorais e nos melanócitos, mas não no tecido ovariano normal (THOMSEN et al, 1994; MASSI et al, 2001). Outros tumores que expressam a NOSi são de cabeça e pescoço (PARK et al, 2003), esôfago (WILSON et al, 1998), pulmão (AMBS et al, 1998), próstata (KLOTZ et al, 1998), tumores do cérebro (COBBS et al, 1995), neoplasias hematológicas (ROMAN et al, 2000; MENDES et al, 2001), dentre outros. Na carcinogênese humana, a NOSi está relacionada na regulação de imunossistemas, apoptose de células e angiogênese (BUTTERY et al, 1993).

O NO foi incriminado como agente de iniciação da carcinogênese, que, associado a outros fatores, poderia levar ao descontrole da citoestase e da diferenciação celular. A diversidade de efeitos do NO parece estar relacionada às concentrações de NO gerados, à sensibilidade individual das células e à duração do fenômeno (MONCADA et al, 1991; SWITZER et al. 2012). Altas concentrações de NO induzem apoptose, mas baixas concentrações estimulam o crescimento tumoral por indução da angiogênese (HAO et al., 2001), fazendo com que o NO apresente uma complexidade de efeitos, ora contribuindo para a regressão do tumor ora para a sua progressão. O NO é, portanto, um alvo atraente para novas estratégias de diagnóstico e prognóstico, e para futuros métodos de terapia no câncer.

2 HIPÓTESE

Os parâmetros clínicos e patológicos de pacientes com neoplasia maligna primária de ovário, tais como o grau histológico, o estadiamento do tumor, a presença de metástases em linfonodos, a resposta da paciente à quimioterapia e a sobrevida livre da doença estão relacionados com a marcação tecidual por imuno-histoquímica de algumas citocinas (IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) e da enzima NOSi.

3 OBJETIVO

Corelacionar a marcação tecidual por imuno-histoquímica de citocinas (IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) e NOSi com parâmetros clínicos e patológicos de pacientes com neoplasia maligna primária de ovário, tais como o grau histológico, o estadiamento do tumor, a presença de metástases em linfonodos, a resposta da paciente à quimioterapia e a sobrevida livre da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Apresentam-se os materiais utilizados e os métodos realizados no desenvolvimento desse estudo. Os materiais são listados abaixo e os métodos são descritos nos itens seguintes.

4.1 MATERIAIS

Como materiais foram incluídos as pacientes, os critérios de inclusão e os critérios de exclusão. Das pacientes, foram analisadas 160, no período de 2009 a 2012, atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM. Dessas 160 pacientes foram selecionadas 40, as quais estavam enquadradas dentro dos critérios de inclusão do trabalho. Essas 40 pacientes representam o “n” deste estudo.

4.1.1 Pacientes

Foram avaliadas de forma prospectiva 40 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia / Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, submetidas a tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos, no período de maio de 2009 a dezembro de 2012 e com posterior diagnóstico confirmado de neoplasia maligna (n=40) de ovário. Os critérios de indicação de laparotomia exploradora foram: cistos anecoicos com diâmetro máximo menor que 7,0 cm e com persistência da alteração por mais que 6 meses e marcadores tumorais normais; marcadores tumorais alterados; cistos anecoicos com diâmetro máximo maior ou igual a 7,0 cm; massas ovarianas com conteúdo sólido, presença de vegetação intracística, 1 septo grosso, 2 ou mais septos finos; *Color Doppler* com índice de resistência menor ou igual a 0,4 (MURTA et al., 2004; MURTA & NOMELINI, 2006).

Foram anotados dados como idade, paridade, raça, tabagismo, história de terapia hormonal, idades da menarca e menopausa, status hormonal, grau histológico, estadiamento (FIGO), tipo histológico, metástases em linfonodos, resposta à quimioterapia (completa, parcial), intervalo livre de doença menor ou igual a 24 meses (presente ou ausente).

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

4.1.2 Critério de inclusão

Diagnóstico pós-operatório de neoplasia maligna primária de ovário pelo anátomo-patológico em parafina. A classificação histológica dos tumores ovarianos segundo a OMS está descrita no Apêndice B.

4.1.3 Critérios de exclusão

- a) Presença de torção do pedículo anexial;
- b) Rotura do cisto durante o procedimento cirúrgico;
- c) Neoplasia maligna secundária de ovário (metástase);
- d) Tratamento prévio à cirurgia (Quimioterapia);
- e) Recidiva.

4.2 MÉTODOS

Na descrição dos métodos apresenta o modelo de estudo, a realização do estudo anátomo-patológico, o protocolo adotado de imuno-histoquímica, o banco de dados, a realização da análise estatística e a redação do texto.

4.2.1 Modelo de estudo

Estudo prospectivo.

4.2.2 Anátomo-patológico

Foi realizado pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, nos cortes embebidos em parafina, sendo que os casos foram revisados por um patologista experiente da disciplina de Patologia Especial. A

avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de acordo com os critérios da International Federation of Gynaecology and Obstetrics – FIGO.

Na avaliação do grau histológico, os tumores de células da granulosa e os tumores *borderline* foram considerados juntamente com o grupo de tumores bem diferenciados (grau 1). Para os demais tumores, foi realizada uma revisão do grau histológico por um patologista, sendo divididos em grau 1 (bem diferenciados), grau 2 (moderadamente diferenciados) e grau 3 (pouco diferenciados).

4.2.3 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 4 µm de espessura, em lâminas silanizadas (APTS - Silano, Sigma® A3648), empregando-se a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase.

As lâminas permaneceram na estufa a uma temperatura de 56°C 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 destilado 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 4°C.

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 overnight a 4°C com o anticorpo primário específico (anti-IL-2, anti-IL-8, anti-TNF- α , anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10 e NOSi), as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente, em torno de 15 minutos, lavadas em PBS e secas, como anteriormente. O anticorpo secundário biotilado (*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 estreptoavidina 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, o Diaminobenzidine (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.

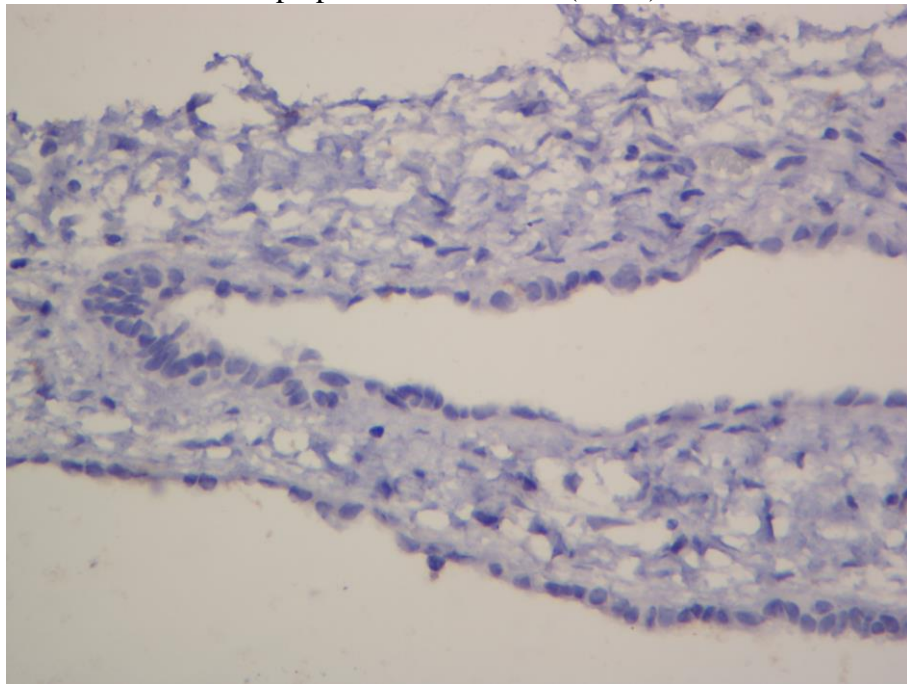
Finalmente, as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool absoluto por cerca de 10 segundos cada, para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol, por 5 minutos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com entellan para posterior análise.

As soluções e tampões utilizados constam no Apêndice D.

Foram utilizados controles positivo e negativo. Três observadores avaliaram as lâminas. A intensidade de marcação foi avaliada subjetivamente no tecido tumoral utilizando-se 0 a 3: 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação forte) (ÖZEL et al., 2006).

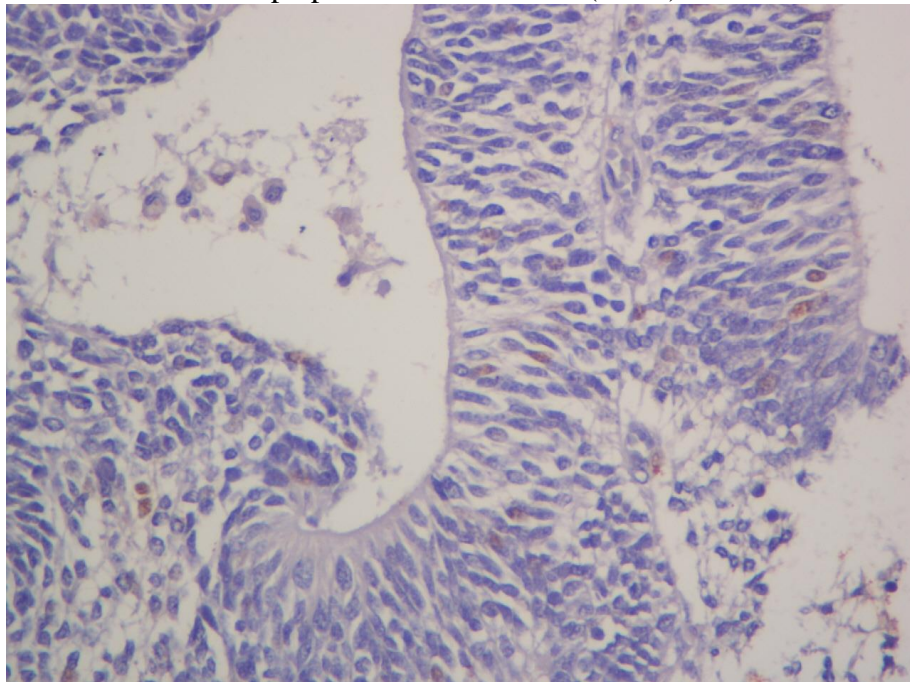
As intensidades de marcação de imuno-histoquímica 0 e 1 (Figuras 1 e 2, respectivamente) foram consideradas como marcação de fraca intensidade, e 2 e 3 (figuras 3 e 4, respectivamente) como marcação de forte intensidade.

Figura 1 – Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando a marcação 0 (zero) por imuno- histoquímica de anticorpo policlonal ant-IL-6 (400X).



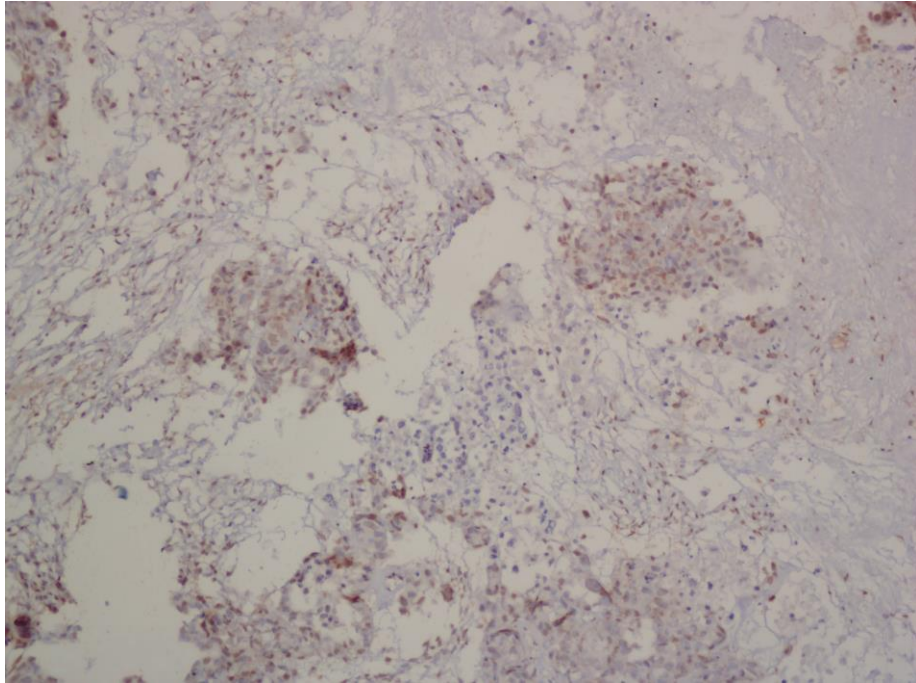
Fonte: O Autor

Figura 2 – Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 1 (um) por imuno- histoquímica de anticorpo policlonal anti-IL-10 (400X).



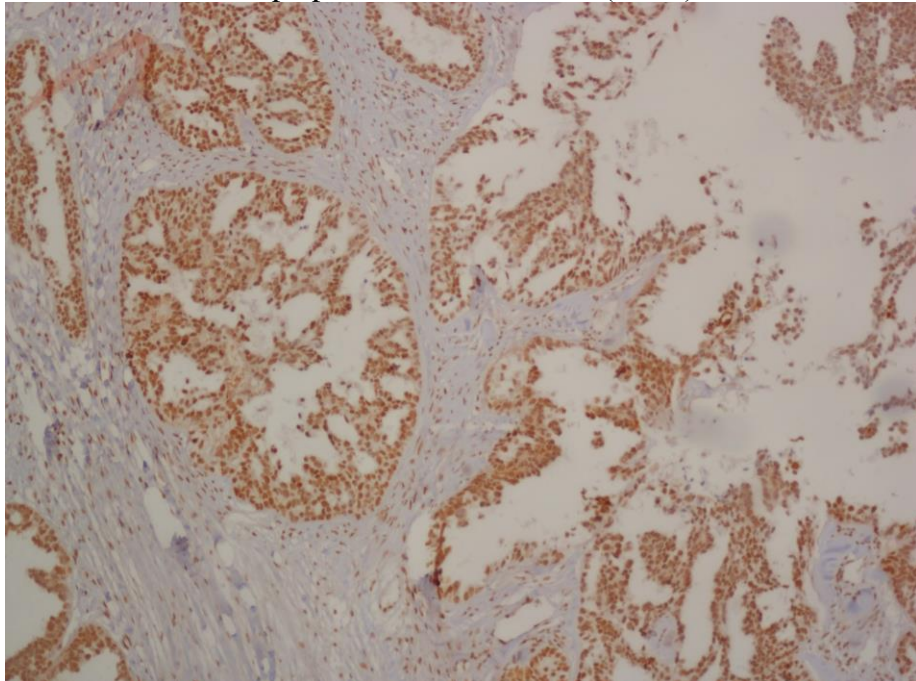
Fonte: O Autor

Figura 3 – Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 2 (dois) por imuno-histoquímica de anticorpo policlonal anti-TNF- α (100X).



Fonte: O Autor

Figura 4 – Corte histológico de neoplasia maligna ovariana, evidenciando marcação 3 (três) por imuno-histoquímica de anticorpo policlonal anti-TNF- α (100X).



Fonte: O Autor

4.2.4 Banco de dados

Os dados clínicos, laboratoriais e cirúrgicos das pacientes estudadas foram arquivados em banco de dados específico para o estudo. Foram utilizados o Microsoft Excel[®] e Microsoft Word[®]

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo GraphPad InStat software. No estudo imuno-histoquímico, três observadores avaliaram as lâminas, e a concordância entre os mesmos foi realizada 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). O primeiro kappa inter-observadores foi entre 0.8 e 1.0 (entre forte e perfeita concordância). Todos os casos discordantes foram reavaliados e o resultado foi definido por consenso.

A avaliação dos fatores prognósticos foi realizada pelo teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 0,05.

4.2.6 Redação do texto

O texto foi redigido conforme as normas técnicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) de 2012.

5 RESULTADOS

Foram avaliadas 40 pacientes com neoplasia maligna de ovário. A média de idade foi de $48,1 \pm 15,0$ anos, a média de paridade foi de $2,6 \pm 2,2$ partos, a idade média da menarca foi $13,0 \pm 1,6$ anos, a idade média da menopausa foi $49,5 \pm 4,7$ anos. Em relação ao uso de método contraceptivo, 3 (7,5%) utilizavam contraceptivo hormonal, 1 (2,5%) utilizava condom, 6 (15%) foram submetidas à laqueadura tubária e 30 (75%) não utilizavam nenhum método contraceptivo. Uma paciente (2,5%) utilizava terapia de reposição hormonal e 10 pacientes (25%) eram tabagistas. Em relação ao status hormonal, 17 (42,5%) estavam em menacme e 23 (57,5 %) estavam na menopausa. Sete pacientes (17,5%) foram a óbito (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Variáveis quantitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012.

Grupo Neoplasia Maligna (n=40)	
Idade (anos)	$48,1 \pm 15,0$
Gestação	$2,9 \pm 2,4$
Paridade	$2,6 \pm 2,2$
Idade Menarca (anos)	$13,0 \pm 1,6$
Idade Menopausa (anos)	$49,5 \pm 4,7$
Níveis de CA 125 (U/ml)	$154,7 \pm 305,3$
Níveis de CA 15,3 (U/ml)	$55,5 \pm 137,7$
Níveis de CA 19,9 (U/ml)	$24,8 \pm 42,2$
Níveis de CEA (U/ml)	$4,0 \pm 9,2$
Níveis de AFP (U/ml)	$37,9 \pm 173,0$
Volume da massa ao ultrassom (ml)	$916,3 \pm 878,3$
Maior diâmetro da massa ao ultrassom (cm)	$15,4 \pm 13,8$
Sobrevida livre da doença (meses)	$37,0 \pm 32,9$
Número de ciclos de quimioterapia	$5,9 \pm 0,5$

Fonte: O Autor

Tabela 2 – Variáveis qualitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012.

Grupo Neoplasia Maligna (n=40)		
	n	%
<i>Estado civil</i>		
Casadas	22	55
Divorciadas	2	5,0
Solteiras	11	27,5
Viúvas	5	12,5
<i>Método Contraceptivo</i>		
Hormonal	3	7,5
Barreira	1	2,5
Laqueadura Tubária	6	15
Nenhum	30	75
<i>Status Hormonal</i>		
Menacme	17	42,5
Menopausa	23	57,5
<i>Óbito</i>		
Sim	7	17,5
Não	33	82,5
<i>Terapia Hormonal</i>		
Sim	1	2,5
Não	39	97,5
<i>Tabagismo</i>		
Sim	10	25
Não	30	75

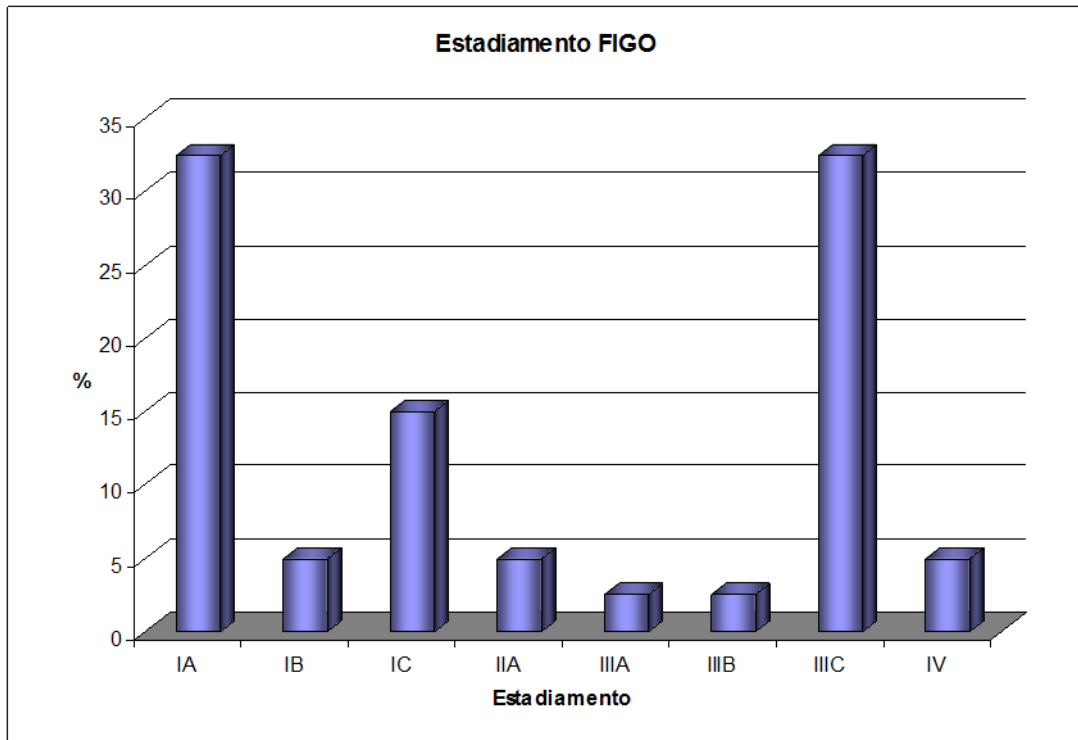
Fonte: O Autor

Em relação ao esquema de quimioterapia utilizado, 25 pacientes (62,5%) utilizaram esquema baseado em platinum, 2 (5%) utilizaram taxano, 1 (2,5%) realizou quimioterapia em outro serviço e 12 (30%) não realizaram quimioterapia.

Quanto ao tipo de cirurgia, 4 (10%) foram submetidas a citorredução, 28 (70%) foram submetidas a cirurgia completa e 8 (20%) foram submetidas a salpingooforectomia.

Quanto ao estadiamento da FIGO (Apêndice C), 13 (32,5%) estavam em estágio IA, 2 (5%) IB, 6 (15%) IC, 2 (5%) IIA, 1 (2,5%) IIIA, 1 (2,5%) IIIB, 13 (32,5%) IIIC e 2 (5%) IV (Figura 5).

Figura 5 – Frequência (%) dos tipos de estadiamento para câncer ovariano segundo a Federação Internacional de Obstetrícia e Ginecologia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012.



Fonte: O Autor

Em relação às metástases em linfonodos, estas estavam presentes em 4 (10%) pacientes, ausentes em 18 (45%) pacientes e não foram avaliadas em 18 (45%) pacientes.

A tabela 3 demonstra os tipos histológicos das neoplasias malignas de ovário.

Tabela 3 – Tipo Histológico dos tumores das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2012.

	Grupo Neoplasia Maligna (n=40)	
	n	%
Adenocarcinoma	1	2,5
Adenocarcinoma anaplásico papilífero	2	5
Adenocarcinoma endometrióide	1	2,5
Adenocarcinoma papilífero seroso	8	20
Carcinóide do ovário	1	2,5
Carcinoma de células claras	1	2,5
Carcinoma epidermóide grau III em teratoma	1	2,5
Cistoadenocarcinoma mucinoso	2	5
Cistoadenocarcinoma seroso	2	5
Cistoadenocarcinoma mucinoso <i>borderline</i>	10	25
Disgerminoma	2	5
Cistoadenocarcinoma seroso <i>borderline</i>	1	2,5
Tumor de células da granulosa	5	12,5
Tumor de células da granulosa + Tumor de Brenner	1	2,5
Tumor de células germinativas misto	1	2,5
Tumor endometrióide proliferativo atípico <i>borderline</i>	1	2,5

Fonte: O Autor

Quanto ao grau histológico, 19 (47,5%) eram grau 1, 12 (30%) eram grau 2 e 9 (22,5%) eram grau 3.

Em relação ao intervalo livre de doença menor ou igual a 24 meses, estava ausente em 13 (32,5%), presente em 23 (57,5%) e 4 (10%) pacientes perderam o seguimento.

A tabela 4 mostra a relação entre as citocinas estudadas e os fatores prognósticos. Grau histológico 1 esteve significativamente relacionado com marcação imuno-histoquímica de forte intensidade para TNF- α ($p=0.0028$). Ainda em relação ao TNF- α , estádios iniciais (I e II, FIGO) estiveram mais relacionados com forte intensidade de marcação imuno-histoquímica no limite de significância estatística ($p=0.0525$). Não houve significância estatística em relação às demais citocinas estudadas ou em relação à NOSi.

Tabela 4 – Distribuição de citocinas com intensidade 2 e 3 de marcação de acordo com o grau histológico tumoral, estadiamento tumoral, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença ≤ 24 meses.

		TNF- α	IL2	IL5	IL6	IL8	IL10	NOSi
Grau Histológico (n=40)	1	17/19 (89.5%)*	17/19 (89.5%)	11/19 (57.9%)	12/19 (63.2%)	11/19 (57.9%)	12/19 (63.2%)	11/19 (57,9%)
	2/3	9/21 (42.9%)	19/21 (90.5%)	10/21 (47.6%)	15/21 (71.4%)	12/21 (57.1%)	15/21 (71.4%)	16/21 (76,2%)
Estadiamento (FIGO) (n=40)	I/II	18/23 (78.3%)**	21/23 (91.3%)	13/23 (56.5%)	16/23 (69.6%)	13/23 (56.5%)	15/23 (65.2%)	13/23 (56,5%)
	III/IV	8/17 (47.1%)	15/17 (88.2%)	8/17 (47.1%)	11/17 (64.7%)	10/17 (58.8%)	12/17 (70.6%)	14/17 (82,4%)
Metástases em Linfonodos (n=22)	Negativo	13/18 (72.2%)	17/18 (94.4%)	12/18 (66.7%)	12/18 (66.7%)	9/18 (50%)	12/18 (66.7%)	10/18 (55,6%)
	Positivo	2/4 (50%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)	2/4 (50%)	3/4 (75%)	3/4 (75%)	3/4 (75%)
Resposta à Quimioterapia (n=27)	Completa	10/19 (52,6%)	16/19 (84.2%)	11/19 (57.9%)	11/19 (57.9%)	9/19 (47.4%)	12/19 (63.2%)	13/19 (68,4%)
	Parcial	0/2 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Sobrevida livre da doença ≤ 24 meses (n=36)	Presente	14/23 (60.9%)	21/23 (91.3%)	13/23 (56.5%)	16/23 (69.6%)	12/23 (52.2%)	16/23 (69.6%)	16/23 (69,6%)
	Ausente	10/13 (76.9%)	12/13 (92.3%)	4/13 (30.8%)	8/13 (61.5%)	9/13 (69.2%)	8/13 (61.5%)	8/13 (61,5%)

*P < 0,0028, comparado ao grau 2/3; ** p = 0,0525, comparado ao grau II/III (Teste exato de Fisher).

Fonte: O Autor

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo avaliou a marcação tecidual por imuno-histoquímica de algumas citocinas de padrão TH1 (IL-2, IL-8 e TNF- α) e TH2 (IL-5, IL-6 e IL-10) e NOSi no tecido ovariano tumoral, verificando a sua presença ou ausência e intensidade de produção no epitélio do tumor.

Em nosso trabalho, a média de idade das pacientes com neoplasia maligna de ovário foi de $48,1 \pm 15,0$ anos, dado este menor que a relatada pela literatura (YANCIK, 1993). Isso pode ser explicado pela inclusão de tumores germinativos e dos cordões sexuais, que ocorrem com maior frequência em idades mais jovens (BJORRKHOLM & PETERSSON, 1980; SCHWEPPE & BELLER, 1982).

Em relação ao estadiamento, 52,5% das pacientes foram diagnosticadas em estadiamento I, 5% das pacientes em estadiamento II e 42,5% em estadiamentos III ou IV. Conforme a literatura, grande parte das neoplasias malignas de ovário são diagnosticadas em estadiamentos III e IV, portanto, têm um prognóstico muito pobre. (HENNESSY et al., 2009) e cerca de um terço dos casos de câncer de ovário são diagnosticados em estadiamentos I ou II (HACKER et al., 1983). Essa divergência poderia ser explicada pela inclusão de tumores não epiteliais, com melhor prognóstico.

Grande quantidade de leucócitos, principalmente macrófagos e linfócitos (células mononucleares associadas ao tumor – TAMs), podem ser encontrados no estroma tumoral (NEGUS et al., 1997) e em efusões neoplásicas (MANTOVANI, 1997), sendo capazes de produzir citocinas tipo TH1 e TH2. Um progressivo desvio no comportamento das TAMs no perfil de produção TH1 a TH2 pode ocorrer durante a progressão tumoral, o que reduziria a resposta imune ao tumor (MANTOVANI et al., 1997).

No câncer de mama, algumas citocinas estimulam (IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α) enquanto outras inibem (IL-12, IL-18, IFNs) a proliferação e/ou invasão pelas células malignas. Os interferons, IL-2 e ocasionalmente IL-6 e IL-12 são utilizados no tratamento para câncer avançado, para aumentar a sensibilidade hormonal ou estimular a imunidade celular (NICOLINI et al., 2006). Em câncer de mama, foram demonstradas altas concentrações sérias de IL-6, IL-8 e IL-10 comparadas com mulheres sadias (KOZŁOWSKI et al., 2003). Além disso, os níveis séricos de IL-10 e a expressão tecidual dessa citocina foram mais altos em pacientes com neoplasia maligna de ovário em comparação com neoplasias benignas e controles normais (ZHOU et al., 2007).

Existem diferenças no microambiente tumoral entre neoplasias benignas, malignas e tumores não neoplásicos, sugerindo um papel das citocinas na progressão tumoral (TAVARES-MURTA et al., 2004). Níveis séricos de IL-6, IL-8 e IL-18 podem se correlacionar ao pior prognóstico no câncer de ovário e com a sobrevida global (SCAMBIA et al., 1995; KASSIM et al., 2004; AKAHIRO et al., 2004). Aumento sistêmico de IL-12 e IL-16 pode ser observado durante a progressão tumoral (KOVACS, 2001). A análise da expressão de citocinas através de RT-PCR em RNA isolado de carcinoma de ovário demonstrou presença de TGF e IL-10 e ausência de IFN- γ ; sendo que metade desses tumores expressou GM-CSF e IL-8 (MEROGI et al., 1996).

A citocina pró-inflamatória, (TNF- α), está alterada em tumores malignos de ovário em comparação com o epitélio normal da superfície ovariana. Vários estudos têm associado à inflamação com a tumorigênese ovariana, indicando que o TNF- α desempenha um papel chave na modulação da invasão, angiogênese e metástase tumoral (SZLOSAREK et al., 2007; SETHI et al., 2008). A atividade biológica do TNF- α pode ser modulada pelos seus receptores de superfície de membrana, os TNF-R. Estas proteínas são expressas na superfície da membrana e tem grande capacidade de se ligarem ao TNF (BALKWILL, 2006; BERTAZZA et al., 2008). A regulação dos TNF-Rs é um fator crítico para se verificar a capacidade de resposta das células tumorais ao TNF- α . Os níveis de TNF- α no tecido tumoral podem ser mais relevantes quando comparados com os seus níveis séricos (DOBRZYCKA et al., 2009). Os TNF-R apresentam também uma forma solúvel, os sTNF-R, e estas formas são antagonistas de citocinas específicas. Elas se ligam no TNF- α circulante e inibem a sua atividade biológica, impedindo a sua ligação aos receptores celulares. Altas concentrações de TNF-R solúvel podem inibir a atividade do TNF e podem, assim, representar um mecanismo de escape do tumor contra os efeitos destrutivos de TNF- α . Embora o papel patogênico real dos sTNF-Rs permaneça controverso, eles têm sido propostos como marcadores fidedignos de local de produção de TNF- α (ANDERSON et al., 2004; SZLOSAREK et al., 2006)

Alguns estudos têm associado à detecção de níveis anormais e elevados de TNF- α no sangue de paciente com câncer do ovário e pacientes com uma ampla variedade de tipos de tumor (GADDUCCI et al., 1995; RADKE et al., 1996). Estes estudos também têm demonstrado que o TNF- α exerce importante papel na promoção do crescimento tumoral e na progressão de neoplasias malignas de ovário (DOBRZYCKA et al., 2009; CHARLES et al., 2009; HASSAN et al., 2009). Nowak et al. (2010) encontraram produção aumentada de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico em pacientes com câncer de ovário

comparada com casos não malignos. Também observaram que a produção de altos níveis de IL-10 e TGF- β 1 pelas células malignas de ovário diminuem a produção de Interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α , suprimindo a resposta imune contra as células tumorais. No entanto, o TNF- α circulante nem sempre é detectável em pacientes com câncer e as suas concentrações podem variar de indivíduo para indivíduo durante o tempo e o curso da doença (SZLOSAREK et al., 2006; DARAI et al., 2003). Nosso estudo demonstrou que o grau histológico 1 correlacionou significativamente com marcação em forte intensidade de TNF- α ($p = 0.0028$). Ainda em relação a essa citocina, estádios iniciais (I e II, FIGO) foram mais relacionados a marcação de forte intensidade pela imuno-histoquímica no limiar de significância estatística ($p = 0.0525$). A literatura relata alguns estudos mostrando a forte marcação imuno-histoquímica para TNF- α no tecido de neoplasias malignas comparado com marcação em neoplasias benignas. Mas em nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro estudo que correlaciona à intensidade de marcação imuno-histoquímica do TNF- α com o estadiamento e o grau histológico.

Marcação forte por imuno-histoquímica de IL-5 esteve relacionada com sobrevida livre de doença menor ou igual a 24 meses, sugerindo ser um fator de mau prognóstico, mas não houve significância estatística ($p=0.1771$). Apenas um estudo na literatura mostrou a relação de altos níveis séricos de IL-5 com tumores de alto grau histológico e doença avançada (TSAI-TURTON et al., 2009).

A ativação de linfócitos-T através da interação de receptores com antígenos células-T específicos leva à produção de IL-2. A ligação dessa interleucina com seu receptor de alta afinidade em células T promove a proliferação e diferenciação de células efetoras (WALDMANN, 1991) e libera o receptor solúvel de IL-2 (sIL-2R) na circulação (RUBIN et al., 1985). A presença de altos níveis de receptores de IL-2 tem sido encontrada no soro de pacientes com vários tipos de tumores sólidos (LISSONI et al., 1990; BRUNETTI et al., 1999). Em neoplasia maligna de ovário, um aumento nas concentrações de receptor de IL-2 pode ser encontrado em estadiamentos mais avançados, podendo ter um papel na predição do risco de recorrência (GEBAUER et al., 1999). Níveis séricos do receptor de IL-2 estiveram significativamente elevados em pacientes com câncer de ovário comparando-se com tumores ginecológicos benignos e pacientes sem doenças, e podem refletir o estado do sistema imune e a gravidade da doença, sendo um possível marcador de prognóstico (GADDUCCI et al., 1994; WANG et al., 1998).

A interleucina 6 é produzida por fibroblastos, células endoteliais, monócitos/macrófagos, queratinócitos, células T, mastócitos e diversas linhagens tumorais (VAN SNICK, 1990). É uma citocina pró-inflamatória, desempenhando importante papel em resposta de fase aguda, sistema imune e hematopoiese (ŁUKASZEWICZ et.al., 2007). Sua elevação sérica está associada com diversas neoplasias, como câncer endometrial (BELLONE et al., 2005), colorretal (BELLUCO et al., 2000), de próstata (STARK et al., 2009), pulmonar (SONGÜR et al., 2004) e carcinoma renal (NEGRIER et al., 2004). Scambia et al (1995) evidenciaram que níveis séricos elevados de IL-6 estavam relacionados com pior prognóstico, pois pacientes com níveis baixos dessa citocina apresentaram maior sobrevida, independente de outros fatores prognósticos conhecidos como idade e doença residual.

Zhou et al. (2007) ao avaliarem a expressão de IL-10 em carcinoma primário de ovário, observaram que o nível tecidual desta citocina foi significativamente maior nos casos malignos comparados com neoplasia benigna e controles normais. Além disso, os casos malignos também apresentaram níveis séricos e do líquido ascítico significativamente elevados de IL-10, sugerindo que as células malignas podem sintetizar esta interleucina, que provavelmente auxilia na promoção e desenvolvimento do carcinoma de ovário.

Não encontramos nenhuma significância estatística com relação à marcação por IL-2, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, o que poderia ser devido ao número pequeno de pacientes do estudo, ou então essas interleucinas poderiam desempenhar um papel diferente no tecido tumoral.

A literatura mostra que a maioria das neoplasias ovarianas malignas apresenta atividade da NOS, enquanto que ela foi detectada em baixos níveis em pacientes sem câncer (THOMSEN et al., 1994; NOMELINI et al., 2009). Ações inibitórias ou estimuladoras do desenvolvimento de tumores podem ocorrer na dependência dos níveis de expressão da NOSi e conseqüente produção de NO no microambiente tumoral. Se por um lado, NO produzido em concentrações elevadas pela NOSi induzida em macrófagos pela ação de citocinas inflamatórias exerce efeitos citostáticos/citotóxicos sobre células tumorais, por outro o NO produzido em baixas concentrações pela NOSi expressa constitutivamente em tumores pode ser um importante fator de progressão tumoral. (SWITZER et al., 2012).

Há uma complexa relação entre a expressão de NO, a resposta imune e a progressão do câncer. Tumores em estádios mais avançados expressam baixos níveis de NOSi. Nosso estudo não mostrou significância estatística para a NOSi. Os efeitos aparentemente opostos do NO têm sido atribuídos a muitos fatores como diferenças na isoforma das enzimas NOS, níveis de expressão, linhagens celulares ou tecidos tumorais heterogêneos (XIE &

FIDLER, 1998).

Tendo em mente os diferentes papéis que o óxido nítrico desempenha na célula e seus efeitos influenciando a regulação do crescimento ou inibição tumoral, faz-se necessário um entendimento sobre a regulação da produção do NO nestes processos, além de buscar elucidar o papel de cada isoforma de NOS em diferentes tipos de tumores e seu envolvimento no desenvolvimento do tumor, produção de metástases e angiogênese.

A ativação da imunidade inata e da resposta inflamatória leva a produção de citocinas que podem tanto estimular, quando inibir o crescimento tumoral (LIN; KARIN, 2007), e seus níveis séricos são estudados como possíveis marcadores para diagnóstico e prognóstico. Novos estudos são necessários para uma melhor definição sobre o papel dessas citocinas no prognóstico de pacientes com neoplasia maligna de ovário, sendo o TNF- α possível alvo para novas terapias para essa neoplasia.

Há a necessidade de se definir fatores relacionados ao prognóstico em neoplasias malignas de ovário. O estudo da imunologia em câncer de ovário pode auxiliar um melhor entendimento de padrões da resposta tumoral aos vários tratamentos. Assim, o estudo de novos fatores prognósticos é importante para um melhor tratamento cirúrgico e adjuvante das pacientes, já que o tratamento dessa malignidade ainda é um desafio em Oncologia Ginecológica.

7 CONCLUSÃO

Houve correlação positiva entre a marcação imuno-histoquímica de forte intensidade para TNF- α com as neoplasias malignas de ovário de grau histológico 1 e com os estadiamentos mais iniciais da doença (I e II, FIGO). Isso demonstra uma relação positiva entre o TNF- α e o melhor prognóstico do câncer de ovário. Não houve significância estatística em relação às demais citocinas estudadas.

O estudo da imunologia no câncer de ovário pode ajudar a compreender melhor os padrões de resposta do tumor para vários tratamentos. Portanto, o estudo de novos marcadores prognósticos no câncer primário do ovário é importante para o planejamento cirúrgico e adjuvante de pacientes, visto que o tratamento desta neoplasia ainda é um desafio para a Oncologia Ginecológica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. In: ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. p. 253-276.
- AGGARWAL, B. B. et al. Inflammation and cancer: how hot is the link. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 72, n. 11, p. 1605-1621, Nov. 2006.
- AGARWAL, R.; KAYE, S. B. Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? **Ann. Oncol.**, Dordrecht, v. 16, n. 1, p. 4-6, 2005.
- AKAHIRO, J. et al. Impact of serum interleukin-18 level as a prognostic indicator in patients with epithelial ovarian carcinoma. **Int. J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v. 9, n. 1, p. 42-46, Feb. 2004.
- AKAIKE, T.; MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, Oxford, v.101, n.3, p.300-308, Mar./Apr. 2000.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, London, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2013**. Atlanta, GA, 2013.
Disponível em:
<<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/ACSFC-036845>>.
Acesso em: 10 mar. 2013.
- AMBS, S. et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. **Br. J. Cancer.**, London, v. 78, n. 2, p. 233-239, 1998.
- ANDERSON, G. M.; NAKADA, M. T.; DeWITTE, M. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. **Curr. Opin. Pharmacol.**, Oxford, v. 4, p. 3014-320, 2004.
- ARANGO, H. G. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 93-113.
- ATHANASSIADOU, P. et al. The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. **Pathol. Immunopathol. Res.**, Basel, v. 204, n. 4, p. 241-249, Jan.2008.
- BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor: **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 135-141, 2002.
- BALKWILL, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, Hague, v. 25, n. 3, p. 409-416, 2006.
- BAMIAS, A.; TSIATAS, M. L.; KAFANTARI, E. Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3+CD56+ cells with platinum resistance. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 106, p. 75-81, 2007.

BECHT, E. L. M. K.; BONAVIDA, B. Inhibitory effects of 17 β -estradiol and progesterone on ovarian carcinoma cell proliferation: a potential role for inducible nitric oxide synthase. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 82, n. 1, p. 127-138, July, 2001.

BECKER, H. M. G. et al.. Perfil de citocinas e tipificação de hla em pacientes com polipose nasossinusal tolerantes e intolerantes a aspirina. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** São Paulo, v. 69, n. 3, May/June, 2003.

BELISLE, J. A. et al. Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). **Immunology**, Oxford, v. 122, n. 3, p. 418-429, Nov. 2007.

BELLONE, S. et al. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 98, p. 92-98, 2005.

BELLUCO, C. et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**, New York, v. 7, n. 2, p. 133-138, 2000.

BENOY, I. H.; SALGADO, R.; DAM, P. V. et al. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 10, n. 21, p. 7157-7162, 2004.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. **Front. biosci.**, Tampa, v. 13, p. 2736-2743.

BHOOLA, S.; HOSKINS, W. J. Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 107, p. 1.399-1.410, 2006.

BJORKHOLM, E.; PETTERSON, F. Granulosa-cell and theca-cell tumors: the clinical picture and long-term outcome for the radiumhemmet. **Obstet. Gynecol. Scand.**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 361-365, 1980.

BREWER, M. A. et. al. Prevection of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 9, p. 20-30, 2003.

BRUNETTI, G.; BOSSI, A.; BAIARDI, P. et al. Soluble interleukin 2 receptor (sIL2R) in monitoring advanced lung cancer during chemotherapy. **Lung Cancer**, Limerick, v. 23, n. 1 p. 1-9, Jan., 1999.

BULUT, A. S. et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in benign and malignant breast epithelium: an immunohistochemical study of 151 cases. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 447, p. 24-30, 2005.

BUTTERY, L. D. K. et al. Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumors in mice. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.171, p.311-319, 1993.

CANNISTRA, S. A. Cancer of the ovary. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 351, n. 24, p. 2519-2529, 2004.

- CASAGRANDE, J. T. et al. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. **Lancet**, London, v. 2, n. 8135, p. 170-173, July, 1979.
- CASEY, M.J. et al., Histology of prophylactically removed ovaries from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers compared with non-carriers in hereditary breast ovarian cancer syndrome kindreds. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 78, p. 278-287, 2000.
- CHARLES, K. A.; KULBE, H.; SOPER, R. et al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 119, n. 10, p. 3011-3023, Oct., 2009.
- CHERCHI, P. L. et al. Intracystic evaluation of tumor markers in benign and malignant ovarian pathology. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, Montreal, v. 23, p. 163-165, 2002.
- CHOBANIAN, N.; DIETRICH, C. Cáncer de ovario. **Surg. oncol. clin. N. Am.**, Philadelphia, v. 88, p. 285-299, 2008.
- CIANFRANI, T. "A short history of obstetrics and gynecology". Springfield: CC Thomas, 1960.
- COBBS, C. S. et al. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 724-730. Apr. 1995.
- CORMIO, G. et al. Distant metastasis in ovarian carcinoma. **Int. J. Gynecol. Cancer**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 125-129, Mar./Apr. 2003.
- CURRIEL, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat. Med.**, New York, v. 10, n. 9, p.942-949, Sept. 2004.
- DACHS, G. U.; TOZER, G. M. Hypoxia modulated gene expression: Angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 36, n. 13, p.1649-1660, 2000.
- DALY, M.; OBRANS, G. I. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. **Semin. Oncol.**, New York, v. 25, p. 255, 1998.
- DALTOÉ, R. D. et al. O papel paradoxal do sistema imune no câncer de ovário. **ACM: arquivos catarinenses de medicina**, Florianópolis, v. 39, n. 2, p. 87-92, 2010.
- DARAI, E. et al. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. **Hum. Reprod.**, Oxford. v. 18, p. 1681-1685, 2003.
- DESPHANDE, R. R. et al. Alterations of cytokine production in follicular cyclic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v. 44, p. 80-88, 2000.
- DEUTSCH, M. et al. Metastatic brain tumor following negative second-look operation for ovarian carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 27, n. 1, p. 116-20, May, 1987.

- DOBZYCKA, B. et al. Circulating levels of TNF- α and its soluble receptors in the plasma of patients with epithelial ovarian cancer. **Eur. Cytokine Netw.**, Montrouge, v. 20, n. 3, p. 131-134, Sept. 2009.
- DORUM, A. et al. Early detection of familial ovarian cancer. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 32, p. 1645-1651, 1996.
- FELDMAN, G. B.; KNAPP, R. C. Lymphatic drainage of the peritoneal cavity and its significance in ovarian cancer. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 119, n. 7, p. 991-994, Aug. 1974.
- FISHMAN, D. et al. The role of ultrasound evaluation in the detection of early-stage epithelial ovarian cancer. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 192, p. 1214-1222, 2005.
- FLORES, M. D. et al. El oxido nítrico como principal efector del sistema de la interleucina-1 em la ovulacion. **Gac. Mex.**, Ciudad del Mexico, v. 137, n. 4, 2001.
- GADDUCCI, A. et al. Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Boca Raton, v. 69, p. 12-27, 2009.
- GADDUCCI, A. et al. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF), soluble receptors for TNF (55- and 75-kDa sTNFr), and soluble CD14 (sCD14) in epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 58, p. 184-188, 1995.
- GADDUCCI, A. et al. Elevated serum levels of neopterin and soluble interleukin-2 receptor in patients with ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 52, n. 3, p. 386-391, 1994.
- GALON, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, Washington, v. 313, p. 1960-1964, 2006.
- GEBAUER, G. et al. Prognostic relevance of soluble interleukin-2 receptors in patients with ovarian tumors. **Anticancer Res.**, Athens, v. 19, n. 4, p. 2509-2511, April, 1999.
- GEOMINI, P. et al. The accuracy of risk scores in predicting ovarian malignancy: a systematic review. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v. 113, p. 384-394, 2009.
- GRIMM, E. A.; WILSON, D. J.; ROSENBERG, S. A. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. The precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory CTL, and NK cells. **Exp. Med.**, Córdoba, v. 157, p. 884, 1983.
- GUERRIERO, S. et al. Ultrasonography and color Doppler-based triage for adnexal masses to provide the most appropriate surgical approach. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 192, p. 401-406, 2005.
- HACKER, N. F. et al. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 61, n. 4, p. 413-20, Apr. 1983.
- HAGEMANN, T. et al. Ovarian Cancer Polarize Macrophages toward a Tumor-Associated Phenotype. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 176, n. 8, p. 5023-5032, Apr. 2006.

HAMBLIN, A. S. **Cytokines and cytokine receptors**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1993

HAO, X. P. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors from the same patients. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 61, p. 419-422, 2001.

HASSAN, M. I. et al. ovarian cancer-induced immunosuppression: relationship to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release from ovarian tissue. **Anticancer Res.**, Athens, v. 19, n. 6, p. 5657-5662, June, 1999.

HELAL, T. A. et al. Immunophenotyping of tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian carcinoma. **Pathol. Oncol. Res.**, Budapest, v. 10, n. 2, p. 80-84, Feb., 2004.

HENNESSY, B. T.; COLEMAN, R. L.; MARKMAN, M. Ovarian cancer. **Lancet**, London, v. 374, p. 1374-1382, 2009.

HOLSCHNEIDER, C. H., BEREK, J. S. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. **Semin. Surg. Oncol.**, New York, v. 19, p. 3-10, 2000.

HUANG, S. et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 161, n. 1, p. 125-134, 2002.

IGNARRO, L. **Nitric oxide biology and pathobiology**. New York: Academic Press, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer: o que é câncer**. Rio de Janeiro, [entre 1996 e 2013]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 11 abr. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de Ovário**. Rio de Janeiro, [entre 1996 e 2013]. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>>. Acesso em: 11 maio 2012.

INTERNACIONAL OVARIAN TUMOR ANALYSIS. **Information about IOTA**. Leven, 2013. Disponível em: <<http://homes.esat.kuleuven.be/~sistawww/biomed/iota/index.php/iota-info>>. Acesso em: 20 maio 2013.

ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? **J. Clin. Invest.**, New York, v. 111, n. 2, p. 163-169, 2003.

KAIJSER, J. et al. Improving strategies for diagnosing ovarian cancer: a summary of the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) studies. **Ultrasound. Obstet. Gynecol.**, Carnforth, v. 41, p. 9-20, 2013.

KASSIM, S. K. et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 37, p. 363-369, 2004.

- KEHOE, S. et al. The influence of the operating surgeon's specialization on patients survival in ovarian carcinoma. **Br. J. Cancer**, London, v. 70, p. 1014-1017, 1994.
- KLEINERT, H.; SCHWARZ, P. M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol. Chem.**, Berlin, v. 384, n. 10-11, p. 1343-1364, 2003.
- KLOTZ, T. et al. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**, Philadelphia, v. 82, n. 10, p. 1897-1903, Oct. 1998.
- KOVACS, E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumour stage and previous therapy. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 55, p. 111-116, 2001.
- KOZLOWSKI, L. et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. **Rocz. Akad. Med. Bialymst.**, Bialystok, v. 48, p. 82-84, 2003.
- KURIAN, A. W. et al. Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they different risk factors? **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 96, n. 2, p. 520-530, 2005.
- LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncol.**, London, v. 2, n. 3, p. 149-156, 2001.
- LAMKIN, D. M. et al. Positive psychosocial factors and NKT cells in ovarian cancer patients. **Brain, Behavior, and Immunity**, San Diego, v. 22, p. 65-73, Jan. 2008.
- LEROUX, P. D. et al. Cerebral metastases from ovarian carcinoma. **Cancer**, New York, v. 67, n. 8, p. 2194-2199, Apr. 1991.
- LI, J. et al. Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis. **J. Hematol. Oncol.**, London, v. 5, p. 8, 2012.
- LILIAC, L. et al. Ovarian cancer: insights into genetics and pathogeny. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v. 27, n. 6, p. 707-719, 2012.
- LIN, W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007.
- LISSONI, P. et al. The biological significance of soluble interleukin-2 receptors in solid tumors. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 33-36, 1990.
- LLANES-FERNANDEZ, L. et al. Association between the expression of IL-10 and T cell activation proteins loss in early breast cancer patients. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 135, n. 2, p. 255-264, 2009.
- ŁUKASZEWICZ, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, Warsaw, v. 117, n. 5-6, p. 247-251, 2007.
- MANTOVANI, A. et al. Tumorassociated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of

releasing high amounts of various cytokines. **Int. J. Cancer**, New York, v. 71, n. 5, p. 724-731, May, 1997.

MANTOVANI, A. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**, London, v. 435, n. 7043, p. 752-753. 2005.

MANTOVANI, A. et al. The Origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, Amsterdam, v. 13, n. 7, p. 265-270, Jul. 1992.

MARSDEN, D. E.; FRIEDLANDER, M. Current Management of Epithelial Ovarian Carcinoma: A Review. **Semin. Surg. Oncol.**, New York, v. 19, p. 11-19, 2000.

MASSI, D. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 194, n. 2, p. 194-200, 2001.

MAYER, A. R. et al. Ovarian cancer staging: does it require a gynecological oncologist? **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 47, p. 223-227, 1992.

MENDES, R. V. et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. **Histopathology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 172-178, 2001.

MEROGI, A. J. et al. Tumor-host interaction: analysis of cytokines, growth factors and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinomas. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 321-331, 1997.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: Which, where, how, and why? **J. Clin. Invest.**, New York, v. 100, n. 9, p. 2146-2152, 1997.

MILBURN, M. V. et al. A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5. **Nature**, London, v. 363, n. 6425, p. 172-176, 1993.

MINARETZIS, D. et al. Ovarian tumors: prediction of the probability of malignancy by using patient's age and tumor morphologic features with a logistic model. **Gynecol. Obstet. Invest.**, Basel, v. 38, p. 140-144, 1994.

MOCELLIN, S.; BRONTE, V.; NITTI, D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. **Med. Res. Rev.**, New York, v. 27, n. 3, p. 317-352, 2007.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** Baltimore, v. 43, p. 109-142, 1991.

NEGRIER, S. et al. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6--from the Groupe Francais d'Immunotherapie. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 22, n. 12, p. 2371-2378, 2004.

NOWAK, M. et al. Production of cytokines during interaction of peripheral blood mononuclear cells with autologous ovarian cancer cells or benign ovarian tumor cells. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 71, p. 97-98, 2010.

MURDOCH, W. J.; MCDONNELL, A. C. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 6, p. 174-50, June, 2002.

MURTA, E. F. C.; ANDRADE, J. M.; BIGHETTI, S. Aspectos epidemiológicos do câncer de ovário. **J. Bras. Ginecol.**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 269-274, 1995.

MURTA, E. F. C.; NOMELENI, R. S. Early diagnosis and predictors of malignancy in the evaluation of adnexal mass. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 14-9, Feb. 2006.

MURTA, E. F. C. et al. Ultrasonographic criteria and tumor marker assay are good procedures for the diagnosis of ovarian neoplasia in preselected outpatients. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, Montreal, v. 25, p. 707-712, 2004.

NARASIMHAN, K.; CHANGQING, Z.; CHOOLANI, M. Ovarian cancer proteomics: many technologies one goal. **Clin. Proteomics**, London, v. 2, n. 2, p. 195-218, Apr. 2008.

NEGUS, R. P. et al. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 150, p. 1723-17-34, 1997.

NICOLINI, A.; CARPIB, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 17, p. 325-337, 2006.

NOMELENI, R.S. et al. Production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in ovarian cystic tumors. **Mediators Inflamm.**, New York, v. 2008, Jan. 2009.

OLIVIER, R. L. et al. Ca 125 and transvaginalultrasound monitoring in high-risk women cannot prevent the diagnosis of advanced ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 100, p. 20-26, 2006.

OMURA, G. A. et al: Long-term follow up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. **J. Clin. Oncol.** New York, v. 9, p. 1138-1150, 1991.

ORTH, K. et al. Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 91, n. 30, p. 9495-9499, Sept. 1994.

OSMERS, R. G. W. et al. Evaluation of ovarian tumors in the post-menopause by transvaginosonography. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 77, p. 81-88, 1998.

ÖZEL, E. 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? **Int. J. Gynecol. Cancer**, Cambridge, v. 16, p. 549-555, 2006.

PADILLA, L. A.; RADOSEVICH, D.M.; MILAD, M. P. Limitations on the pelvic examination for evaluation of the female pelvic organs. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, Baltimore, v. 88, p. 84-88, 2005.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, London, v. 327, p. 524-526, 1987.

PARK, S. W. et al. The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. **Int. J. Cancer**, New York, v. 107, n. 5, p. 729-738, 2003.

PIVER, M. S.; BARLOW, J. J.; LELE, S. B. Incidence of sbclinical metastasis in stage I and II ovarian carcinoma. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 52, n. 1, p. 100-4, July, 1978.

PRIES, R.; WOLLENBERG, B. Cytokines in head and neck cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 17, p. 141-146, 2006.

RADKE, J. et al. Cytokine level in malignant ascites and peripheral blood of patients with advanced ovarian carcinoma. **Geburtshilfe frauenheilkd.**, Stuttgart, v. 56, p. 83-87, 1996.

REIS, F. J. C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário – papel dos marcadores tumorais. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 222-227, 2005.

RICCI, M. D. et al. **Oncologia ginecológica: aspectos atuais do diagnóstico e do tratamento.** Barueri: Manole, 2008.

RIVOIRE, W. A. et al. Neoplasias de ovário e de trompa de Falópio. In: FREITAS, F. et al. **Rotinas em ginecologia.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 362-384.

ROMAN, V. et al. Expression of a functional inducible nitric oxide synthase in hairy cell leukaemia and ESKOL cell line. **Leukemia**, New Jersey, v. 14, n. 4, p. 696-705, 2000.

RUBIN, S. C. Surgery for ovarian cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 6, p. 851-865, 1992.

RUBIN, L. A. et al. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 135, n. 5, p. 3172-3277, 1985.

SANTIN, A. D. et al. Increased levels of interleukin-10 and transforming growth factor- β in the plasma and ascitic fluid of patients with advanced ovarian cancer. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, Baltimore, v. 108, p. 804-808, 2001.

SATO, E. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 20, n. 51, p. 18538-15543, Dec., 2005.

SCAMBIA, G. et al. Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer. **Br. J. Cancer**, London, v. 71, p. 354-356, 1995.

SCHMELER, K. M. et al. Prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy compared with surveillance in women with BRCA mutations. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v. 108, n. 3, p. 515-520, 2006.

SCHWEPPE, K. W.; BELLER, F. K. Clinical data of granulosa cell tumors. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 104, n. 1, p. 161-169, 1982.

SCULLY, R. E. Pathology of ovarian cancer precursors. **J. Cell. Biochem.**, New York, v. 23, p. 208-218, 1995.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 13, p. 5094-5107, 2008.

SGO COMMITTEE OPINION. Clinical practice committee estatement on prophylactic salpingo-oophorectomy. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 98, p. 179-181, 2005.

SHAH, V. et al. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 126, n. 03, p. 903-913, 2004.

SHI, F. D.; VAN, K. L. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 6, n. 10, p. 751-760, Oct. 2006.

SONGÜR, N. et al. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Tumori**, Milano, v. 90, n. 2, p. 196-200, 2004.

SMITH, H. Clinical management of ovarian cancer [book review]. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 345, n. 2, p. 152-153, 2001.

STARK, J. R. et al. Circulating prediagnostic interleukin-6 and C-reactive protein and prostate cancer incidence and mortality. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 124, n. 11, p. 2683-2689, 2009.

STEIN, R. C.; DALGLEISH, A. G. Immunomodulatory agents: the cytokines. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 30, p. 400-404, 1994.

SWITZER, C. H. et al. Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. **Breast Cancer Res.**, London, v. 14, n. 5, p. 125, Sept. 2012.

SZLOSAREK, P. W. et al. Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. **Mol. Cancer Ther.**, Philadelphia, v. 5, p. 382-390, 2006.

SZPUREK, D. et al. An ultrasonographic morphological index for prediction of ovarian tumor malignancy. **Eur. Gynaecol. Oncol.**, Montreal, v. 26, p. 51-54, 2005.

TABIBZADEH, S. S. et al. Interleukin-6 immunoreactivity in human tumors. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 135, n. 3, p. 427-433, Sept., 1989.

TAILOR, A. et al. Sonographic prediction of malignancy in adnexal masses using an artificial neural network. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, London, v. 106, p. 21-30, 1999.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Differential tumor microenvironment in human ovarian cystic tumors. **Tumori**, Milano, v. 90, p. 491-197, 2004.

THOMSEN, L. L. et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. **Cancer Res.**, London, v. 54, n. 5, p. 1352-1354, 1994.

TIMMERMAN, D. et al. Ovarian cancer prediction in adnexal masses using ultrasound-based logistic regression models: a temporal and external validation study by the IOTA group. **Ultrasound. Obstet. Gynecol.**, Carnforth, v. 36, p. 226-234, 2010.

TIMMERMAN, D. The use of mathematical models to evaluate pelvic masses: can they beat an expert operator? **Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, London, v. 18, p. 91-104, 2004.

TIMMERMAN, D. et al. Subjective assessment of adnexal masses with the use of ultrasonography: an analysis of interobserver variability and experience. **Ultrasound. Obstet. Gynecol.**, Carnforth, v. 13, p. 11-16, 1999.

TITUS-ERNSTOFF, L. et al. Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk. **Br. J. Cancer.**, London, v. 84, n. 5, p. 714-721, 2001.

TSAI-TURTON, M. et al. p53 autoantibodies, cytokine levels and ovarian carcinogenesis. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 114, n. 1, p. 12-17, 2009.

VAKKILA, J; LOTZE, M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 4, n. 8, p. 641-648, Aug., 2004.

VAN HOLSBEKE, C. et al. External validation of diagnostic models to estimate the risk of malignancy in adnexal masses. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 18, p. 815-825, 2012.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **An. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 8, p. 253-278, 1990.

VURAL, P. et al. Tumor necrosis factor alpha (-308), interleukin-6 (-174) and interleukin-10 (-1082) gene polymorphisms in polycystic ovary syndrome. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 61-65, May, 2010.

WALDMANN, T. A. The interleukin-2 receptor. **J. Biological Chemistry**, v. 266, n. 5, p. 2681-2684, 1991.

WANG, S.; CAI, G.; LU, Y. Clinical implication of serum sIL-2R levels in ovarian cancer. **J. Tongji Med. Univ.**, Wuhan, v. 18, n. 2, p. 126-128, 1998.

WILSON, K. T. et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. **Cancer Res.**, London, v. 58, n. 14, p. 2929-2934, 1998.

WOODRUFF, J. D. The pathogenesis of ovarian neoplasia. **Johns Hopkins Med. J.**, Baltimore, v. 144, p. 117-120, 1979.

WU, P. C. et al., Lymph node metastasis and retroperitoneal lymphadenectomy in ovarian cancer. **Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.**, London, v. 3, p. 143-155, 1986.

XIE, K.; FIDLER, I. J. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. **Cancer Metastasis Rev.**, Boston, v. 17, n. 1, p. 55-75, Mar. 1998.

XU, L.; FIDLER, I. J. Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. **Cancer Res.**, London, v. 60, n. 16, p. 4610-4616, 2000.

XU, W. et al. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Res.**, Beijing, v. 12, n. 5-6, p. 311-320, 2002.

YANCIK, R. Ovarian cancer: age contrast in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. **Cancer**, New York, v. 71, p. 517-523, Jan. 1993. Suppl. 2.

YAWN, B. P. et al. Ovarian carcinoma: care and survival in a community-based population. **Clin. Ther.**, Princeton, v. 23, p. 146-159, 2001.

ZANETTA, G.; ROTA, S.; CHIARI, S. The accuracy of staging: An important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. **Ann. Oncol.**, Dordrecht, v. 9, p. 1097-1101, 1998.

ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA, J. R.; KATSAROS, D. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, p. 203-213, 2003.

ZHOU, J. Y. E.; CHEN, H.; GAN, N. The expression of interleukin-10 in patients with primary ovarian epithelial carcinoma and in ovarian carcinoma cell lines. **J. Int. Med. Res.**, Northampton, v. 35, n. 3, p. 290-300, 2007.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO E ESCLARECIMENTO

TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação de parâmetros da resposta inflamatória em neoplasias ovarianas”

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

 Assinatura do pesquisador responsável

 Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato da paciente: _____

Telefone de contato dos pesquisadores: 34-3318-5326

APÊNDICE B - 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

**APÊNDICE C - ESTADIAMENTO DAS NEOPLASIAS MALIGNAS DE OVÁRIO
(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 (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 (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

APÊNDICE D - TAMPÕES E REAGENTES UTILIZADOS EM IMUNO-HISTOQUÍMICA

1. Tampão Citrato pH 6.0:

2,1g de ácido cítrico + 1.000ml de água destilada

Homogeneizar a solução e acertar o pH até 6.0, utilizando solução de Hidróxido de sódio (NaOH a 2N). Conservar em temperatura ambiente.

2. Tampão TRIS/EDTA pH 9.0:

0,09g de EDTA+ 0,30g de TRIZMA BASE + 250ml de água destilada

Homogeneizar a solução e acertar o pH até 9.0, utilizando solução de Hidróxido de sódio (NaOH a 2N). Essa solução é bastante instável, portanto, deve ser utilizada apenas no dia que for feita.

3. Tampão de lavagem PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.2:

Solução Mãe:

81,7g de Cloreto de sódio

2,69g de Fosfato de sódio dibásico

10,5g de Fosfato de sódio monobásico heptahidratado

0.5 ml de Tween 20 (DAKO-51966)

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira.

PBS de uso:

100ml de PBS (solução mãe) + 900ml de água destilada.

Conservar a temperatura ambiente.

4. Solução diluente para anticorpo primário (BSA):

2g de Albumina Bovina + 100ml de PBS de uso

OPÇÃO (DAKO-53022)

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira.

5. Solução de água oxigenada a 3%:

3ml de água oxigenada 30volumes + 97ml de água destilada

**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
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS

1. Verificar se há diferenças na dosagem de citocinas (padrão TH1: IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α ; padrão TH2: IL-5, IL-6 e IL-10) e metabólitos de óxido nítrico (NO) no microambiente tumoral e no plasma entre neoplasias benignas e malignas primárias de ovário.
2. Verificar se há diferenças na marcação tecidual por imunohistoquímica de citocinas (padrão TH1: IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α ; padrão TH2: IL-5, IL-6 e IL-10) e sintase de óxido nítrico (NOS), bem como células imunológicas no tecido (CD4, CD8, CD20, CD25, CD56) entre neoplasias benignas e malignas primárias de ovário.
3. Avaliar se há diferenças na capacidade de resposta inflamatória (atividade fagocítica) de neutrófilos de pacientes com neoplasias benignas e malignas primárias de ovário.
4. Avaliar a expressão dos receptores CXCR1, CXCR2 e CD11b na superfície de neutrófilos circulantes de pacientes com neoplasias ovarianas benignas e malignas, e verificar se existem diferenças na expressão desses receptores quanto ao estágio da doença, no caso de neoplasias malignas.
5. Relacionar a dosagem de citocinas e metabólitos de NO do microambiente tumoral e plasma com parâmetros clínicos e patológicos de pacientes com neoplasia maligna primária de ovário. Este objetivo (exceto plasma) já estava previsto em projeto anterior enviado ao CEP (protocolo número 1366).
6. Relacionar a marcação tecidual por imunohistoquímica de citocinas e NOS, bem como células imunológicas no tecido (CD4, CD8, CD20, CD25, CD56) com parâmetros clínicos e patológicos de pacientes com neoplasia maligna primária de ovário. Este objetivo já estava previsto em projeto anterior enviado ao CEP (protocolo número 1366).
7. Avaliar o efeito do tratamento (cirurgia e quimioterapia) sobre os parâmetros descritos acima (dosagem de citocinas e NO, expressão de citocinas, NOSi e células teciduais, fagocitose, expressão dos receptores CXCR1, CXCR2 e CD11b na superfície de neutrófilos).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de ovário é a nona neoplasia maligna mais frequente e a quinta causa de morte por câncer em mulheres nos estados unidos (American Cancer Society, 2009). a maioria dos tumores malignos de ovário apresenta-se em estádios avançados ao diagnóstico, sendo o câncer ginecológico de maior letalidade (Inca, 2008). Cerca de 5 a 10% dos tumores em estádio aparentemente inicial já apresentam metástases em linfonodos aórticos ou pélvicos e, na doença avançada, cerca de dois terços apresentam essas metástases (Rubin, 1992, Murta et al., 1995). A principal estratégia terapêutica é a cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia. apesar dos esquemas quimioterápicos derivados da platina e dos taxanos, a sobrevida em 5 anos nos estádios iii e iv é de apenas 5 a 15%, enquanto que nos estádios i e ii varia de 80 a 95% (dorun et al., 1996; yawn et al., 2001).

A sensibilidade e a especificidade do exame ginecológico para o rastreamento de neoplasias ovarianas são questionáveis (Murta et al., 2004; Padilla et al., 2005). A ultrassonografia pode ajudar no diagnóstico de tumores ovarianos e na diferenciação entre tumores neoplásicos e não neoplásicos (Minaretzis et al., 1994, Osmer et al. 1998), sendo que o *color Doppler* pode aumentar a especificidade da ultrassonografia transvaginal (Guerriero et al., 2005; Szperek et al., 2005). Porém, o diagnóstico precoce de câncer ovariano pela ultrassonografia ainda é controverso devido à sua baixa prevalência na população geral, dificultando o rastreamento (U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2004; Fishman et al., 2005).

Os marcadores tumorais podem ser úteis no manejo de massas anexiais. Os marcadores CA-15.3, CA-125, CA-19.9 e CEA apresentam alta positividade tanto no soro quanto no fluido intracístico de pacientes com tumores epiteliais malignos

Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar, Sala H – Abadia – Cep: 38025-180

Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854

E-mail: cep@prodepe.uftm.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009

PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

(Cherchi et al., 2002; Tavares-Murta et al., 2004). A associação de ultrassonografia e marcadores tumorais pode melhorar a sensibilidade e a especificidade como fator preditivo de malignidade nas neoplasias ovarianas (Murta et al., 2004).

A identificação de outros fatores prognósticos poderia ser útil para direcionar o tratamento do câncer de ovário, bem como obter novos alvos para o tratamento.

Citocinas - Grande quantidade de leucócitos, principalmente macrófagos e linfócitos (células mononucleares associadas ao tumor – TAMs), podem ser encontrados no estroma tumoral (Negus et al., 1997) e em efusões neoplásicas (Mantovani, 1997), sendo capazes de produzir citocinas tipo TH1 e TH2. Um progressivo desvio no comportamento das TAMs no perfil de produção TH1 a TH2 pode ocorrer durante a progressão tumoral, o que reduziria a resposta imune ao tumor (Mantovani et al., 1997).

A IL-6 pode estar associada à progressão tumoral através da inibição da apoptose das células malignas e estímulo da angiogênese (Siamak, 1989). Elevadas concentrações de IL-6 podem ser encontradas em neoplasias malignas renais, colorretais, ovário, mama, endométrio e pulmões. Em neoplasias malignas de ovário a IL-6 pode influenciar também no prognóstico da doença. Em câncer de mama, pior prognóstico é demonstrado em pacientes com níveis elevados de IL-6, IL-8 e IL-10 (Kozłowski, 2003; Knüpfer, 2007). Elevadas concentrações de IL-6 em carcinoma de endométrio foram relacionadas com aumento da resistência à quimioterapia, apoptose e inibição da função anti-tumoral, assim, IL-6 seria um fator prognóstico na identificação de tumores resistentes à quimioterapia (Bellone et al., 2005).

No câncer de mama, algumas citocinas estimulam (IL-1, IL-6, IL-11, TGF- β) enquanto outras inibem (IL-12, IL-18, IFNs) a proliferação e/ou invasão pelas células malignas. Os interferons, IL-2 e ocasionalmente IL-6 e IL-12 são utilizados no tratamento para câncer avançado, para aumentar a sensibilidade hormonal ou estimular a imunidade celular (Nicolini et al., 2006).

Existem diferenças no micro-ambiente tumoral entre neoplasias benignas, malignas e tumores não neoplásicos, sugerindo um papel das citocinas na progressão tumoral (Tavares-Murta et al., 2004). Níveis séricos de IL-6, IL-8 e IL-18 podem se correlacionar ao pior prognóstico no câncer de ovário e com a sobrevida global (Scambia et al., 1995; Kassim et al., 2004; Akahiro et al., 2004). Aumento sistêmico de IL-12 e IL-16 podem ser observados durante a progressão tumoral (Kovacs, 2001). A análise da expressão de citocinas através de RT-PCR em RNA isolado de carcinoma de ovário demonstrou presença de TGF e IL-10 e ausência de IFN- γ ; sendo que metade desses tumores expressou GM-CSF e IL-8 (Merogi, 1996).

Porém, não há estudos quanto à produção local e sistêmica de citocinas em relação aos diversos fatores prognósticos em um mesmo grupo de pacientes.

Óxido nítrico - O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, pela ação da enzima sintase de NO (NOS), que existe em três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzida (Xu et al., 2002). As isoformas constitutivas (NOSc) são a NOS endotelial (NOSe) e a NOS neuronal (NOSn), produzindo NO em pequenas concentrações e por curtos períodos de tempo. O NO assim produzido tem como mecanismo de transdução a ativação da guanilato ciclase solúvel (GMPc) e está envolvido em respostas fisiológicas como a vasodilatação. A outra isoforma (NOSi) é induzida em macrófagos, células endoteliais e outros tipos celulares após estimulação por lipopolissacarídeo ou citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β . O NO tem sua liberação prolongada e é produzido em maiores concentrações (Moncada et al., 1991).

O NO atua como mediador de efeitos citotóxicos e citostáticos do sistema imune contra infecções e tumores (Chhatwal et al., 1996). Entretanto, como o NO possui um elétron não pareado ele pode reagir com outras moléculas e formar substâncias tóxicas (ex: peroxinitritos) capazes de causar danos ao DNA, podendo ser considerado potencialmente mutagênico e carcinogênico (Rieder et al., 2000). O NO pode ter atividade tumoricida ou estar associado ao crescimento

Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar, Sala H – Abadia – Cep: 38025-180

Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854

E-mail: cep@prodepe.uftm.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009

PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

tumoral, dependendo das concentrações, níveis de expressão ou linhagens celulares (Xie & Fidler, 1998). A expressão de NOSi em carcinomas serosos e de baixo grau foi mais elevada que em carcinomas não serosos e de alto grau (Özel et al., 2006). A produção de NO nos sobrenadantes de cultura de células malignas bem diferenciadas e *borderline* foi maior comparado a tumores pouco diferenciados (Thomsen et al., 1998). Em tumores bem diferenciados, é maior a expressão tecidual de NOSi e dos níveis locais de NO em estadiamentos iniciais (Nomelini et al., 2009).

Além disso, altos níveis de atividade de NOSi e produção de NO foram detectados em células não metastáticas, mas não em células metastáticas (Xie, 1996). Em outro estudo, pacientes com tumores ovarianos avançados com expressão de NOSi e COX-2 tiveram menor sobrevida, enquanto aqueles com expressão negativa de NOSi apresentaram resposta inicial completa à quimioterapia (Raspollini et al., 2004). O NO é, portanto, um alvo atraente para novas estratégias de diagnóstico e prognóstico, e para futuros métodos de terapia no câncer.

Função dos neutrófilos em pacientes com câncer - O papel dos neutrófilos como células de defesa é bem definido em doenças infecciosas, sendo que a função quimiotática dessas células está reduzida em pacientes com sepse, o que poderia ter relação com o prognóstico da doença (Tavares-Murta et al., 2002). Pacientes com câncer apresentam aumento na incidência e/ou gravidade de infecções comparado a indivíduos saudáveis, o que pode ser determinado pela doença ou pelo tratamento quimioterápico. Em particular, os neutrófilos podem apresentar alterações na função quimiotática, fagocítica e oxidativa. A redução da capacidade de migração de neutrófilos já foi demonstrada em vários tipos de câncer, como o gastrointestinal (Duignan et al., 1986) e de colo uterino (Fernandes Jr et al., 2007). Em pacientes com câncer de ovário, as células mononucleares apresentaram atividade citotóxica e fagocítica reduzida comparado a controles (Gordon & Freedman, 2006).

Em relação ao tratamento quimioterápico, já foi demonstrado em pacientes com câncer de mama que ocorre redução da migração de neutrófilos e de sua função fagocítica (Mendonça et al., 2006; Wijayahad et al., 2007).

Receptores de quimiocinas - Receptores de quimiocinas CXC podem contribuir para a progressão de carcinomas ovarianos (Furuya et al., 2007). Foi demonstrado aumento da expressão dos receptores de quimiocinas CXCR1, CXCR4, CCR2, CCR5 e CCR7 em leucócitos de efusões peritoneais e pleurais de pacientes com neoplasia maligna de ovário, avaliados por citometria de fluxo, mas todos os receptores foram raramente expressos em células neoplásicas (Dong et al., 2006). Em neoplasias malignas de mama foi demonstrado aumento do receptor CXCR4 (Davidson et al., 2008).

Porém, há poucos estudos na literatura avaliando a expressão de receptores de quimiocinas em neoplasias malignas de ovário e pouco se sabe sobre o seu comportamento após tratamento.

3. DESCRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Serão avaliadas de forma prospectiva 60 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da UFTM, submetidas a tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos (Murta et al., 2004; Murta & Nomelini, 2006) e com posterior diagnóstico confirmado de neoplasia benigna (n=30) ou maligna (n=30) de ovário.

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Inclusão: diagnóstico de neoplasia benigna ou maligna primária de ovário e, critérios de exclusão: a) torção do pedículo anexial, b) ruptura do cisto durante o procedimento cirúrgico, c) neoplasia maligna secundária de ovário (metástase), d) tratamento prévio e, e) recidiva. Exclusão: a) torção do pedículo anexial, b) ruptura do cisto durante o procedimento cirúrgico, c) neoplasia maligna secundária de ovário (metástase), d) tratamento prévio e, e) recidiva.

5. ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA

Serão avaliadas de forma prospectiva 60 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da UFTM, submetidas a tratamento cirúrgico de



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

acordo com critérios pré-estabelecidos (Murta et al., 2004; Murta & Nomelini, 2006) e com posterior diagnóstico confirmado de neoplasia benigna (n=30) ou maligna (n=30) de ovário. Para os objetivos de números 5 e 6, serão ainda incluídas 20 pacientes com diagnóstico prévio de neoplasia maligna de ovário, cujas lâminas já foram submetidas a imunohistoquímica para NOS, e o líquido intracístico submetido à dosagem de metabólitos de óxido nítrico em protocolo aprovado pelo CEP (número 475). Serão portanto critérios de inclusão: diagnóstico de neoplasia benigna ou maligna primária de ovário e, critérios de exclusão: a) torção do pedículo anexial, b) rotura do cisto durante o procedimento cirúrgico, c) neoplasia maligna secundária de ovário (metástase), d) tratamento prévio e, e) recidiva.

Serão anotados dados como idade, paridade, raça, tabagismo, história de TH, idades da menarca e menopausa, status hormonal, amamentação anterior, história familiar, história anterior de câncer. Nos casos malignos serão anotados: grau histológico, estadiamento (FIGO), tipo histológico, metástases em linfonodos, resposta à quimioterapia (completa, parcial), intervalo livre de doença menor ou igual a 12 meses (presente, ausente), doença residual (> ou <2 cm).

As pacientes serão avaliadas no diagnóstico (comparando-se então neoplasias benignas e malignas) e os casos de neoplasia maligna também após tratamento cirúrgico (cerca de 30 dias após, e imediatamente antes do início da quimioterapia) e quimioterápico (quando ocorrer, sendo nesses casos após o final do sexto ciclo).

Coleta de sangue - Serão coletadas amostras de sangue nos tempos: a) antes de qualquer tratamento, b) após tratamento cirúrgico (cerca de 30 dias após) e, c) após quimioterapia, quando for o caso (ao final do sexto ciclo). Para a dosagem de mediadores será coletada amostra de sangue sem anticoagulante (5 ml), e para o ensaio de fagocitose de neutrófilos e citometria de fluxo será coletada amostra (5 ml) com heparina (100 UI/ml). Como será necessário obtenção de plasma fresco de outro indivíduo para sensibilização das células com partícula fagocítica, este plasma poderá ser obtido de paciente com neoplasia benigna ou de um voluntário sadio.

Coleta do líquido intracístico - Todos os tumores ovarianos com massa ovariana cística, ou sólida com áreas císticas, serão submetidos à punção logo após a exérese do cisto, para obtenção de 20 ml do conteúdo intracístico (avaliação do microambiente tumoral). Serão utilizadas seringas (20 ml) e agulhas (18G) estéreis. O líquido coletado por aspiração lenta será colocado em 2 frascos estéreis, em caixa de isopor com gelo para o transporte até a disciplina de Farmacologia, onde será centrifugado (1500 rpm, 10 min) e o sobrenadante coletado e estocado (- 20°C) até a dosagem de citocinas e metabólitos de NO (Tavares-Murta et al., 2004).

Estudo anátomo-patológico - Será realizado pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do HE - UFTM, nos cortes embebidos em parafina, sendo que os casos serão revisados por um único observador da disciplina de Patologia Especial. A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos serão realizados de acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* – FIGO (FIGO, 1971).

Dosagem de citocinas - Os níveis de IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α (padrão TH1) e de IL-5, IL-6 e IL-10 (padrão TH2) nas amostras de sobrenadante do líquido cístico do ovário e no plasma serão determinados por método imunoenzimático (ELISA). As concentrações das citocinas serão calculadas através de comparação com curvas-padrão das mesmas. Os resultados serão expressos em pg/ml.

Dosagem de metabólitos de NO - A quantificação do nitrato nas amostras de plasma será determinada através da redução enzimática do nitrito com a nitrato redutase (Schmidt et al., 1989). As amostras (40 μ L) serão incubadas com o mesmo volume de tampão redutase (fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5; contendo 1 mM de NADPH, 10 mM de FAD e 4UI de nitrato redutase/mL) por 20 h (37°C). Uma curva padrão de nitrato será determinada por incubação de nitrato sódico (10 a



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

200 µM) com tampão. A quantidade total de metabólitos de NO será então determinada nessas amostras e em amostras de líquido cístico pelo ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1981). A absorbância será medida a 546 nm. Os resultados serão expressos como µM de NO₃⁻ + NO₂⁻ (plasma) ou µM de NO₂ (líquido cístico).

Função fagocítica de neutrófilos - Os neutrófilos obtidos do sangue venoso através de meio próprio (Ficoll-Hypaque), lavados com RPMI contendo soroalbumina bovina 0,01% (RPMI-BSA) (3 vezes, 180 g, 10 min) e ressuspensos no mesmo meio (2 x 10⁶/ml). Zimosan sensibilizado (com plasma normal fresco a 10%) será utilizado como partícula fagocítica (12 partículas/neutrófilo), sendo o zimosan (5 mg/ml) diluído em PBS (1 ml). Esta suspensão (10 ml) será colocada em 1 ml de plasma (10%) e incubado (37°C, 5% CO₂) para sensibilização das partículas, sob agitação. Esta mistura será centrifugada (1200 rpm, 10 min) e serão adicionados 1 ml dos neutrófilos. As células e partículas serão incubadas (1 h, 37°C, 5% CO₂) e após as células serão citocentrifugadas e coradas. Serão contadas 100 células em cada lâmina e o número de partículas fagocitadas. Os resultados serão expressos através do Índice Fagocítico= % de células com fagocitose x número médio de partículas fagocitadas.

Imunohistoquímica - Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica serão processados em parafina e revisados por patologista experiente. Os casos selecionados serão submetidos a novos cortes (4 µm) em lâminas silanizadas (ATPS - Silano, Sigma® A3648), empregando-se a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase. As lâminas permanecerão em estufa (56°C, 24 h) e a seguir serão desparafinizadas (3 banhos de xilol, 5 min cada) e desidratadas (3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%, 10 seg cada). Após, as lâminas permanecerão em banho (PBS, pH 7.2, 5 min), para hidratação. O excesso de tampão será removido e a borda do corte seca com papel absorvente. As lâminas será adicionada água oxigenada (3%, 10 min) sobre cada corte, para ocorrer o bloqueio da peroxidase endógena e após será realizada a lavagem em PBS.

Para a recuperação dos antígenos, as lâminas serão colocadas em tubos contendo solução tampão citrato 10mM (pH 6,0), que serão vedados com papel alumínio e colocados dentro de uma panela a vapor (30 min, 100°C). Os tubos serão retirados e colocados sobre a bancada para resfriamento. Após, as lâminas serão novamente lavadas (3 banhos) em tampão PBS e incubadas com o anticorpo primário (18 h, em câmara úmida, 4°C), diluído em BSA (2%), que permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir coloração de fundo. Após a incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico (anti-NOS, anti-IL-2, anti-IL-8, anti-IFN-γ, anti-TNF-α, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, anti-CD25, anti-CD56) as lâminas serão colocadas em temperatura ambiente (15 min), lavadas (PBS) e secas. O anticorpo secundário biotilado (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*) será adicionado em cada lâmina (30 min, temperatura ambiente, câmara úmida), em seguida ocorrerão lavagens em PBS e as lâminas serão secas. O complexo estreptoavidina peroxidase (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*) será adicionado (30 min) nas mesmas condições acima.

Após lavagem em PBS, as lâminas serão reveladas através de solução cromógena (Diaminobenzidine - DAB), por 5 min. Após, as lâminas serão lavadas (água corrente) e contra-coradas em hematoxilina de Harris. Finalmente as lâminas serão imersas em 3 banhos de álcool absoluto (10 seg cada), para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e 3 banhos de xilol (5 min cada). As lamínulas serão adicionadas sobre as lâminas com *entellan* para posterior análise.

Dois observadores avaliarão as lâminas e a intensidade de marcação será avaliada subjetivamente utilizando-se 0 a 3: 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação forte).

Expressão dos receptores CXCR1, CXCR2 e CD11 em neutrófilos e células mononucleares por citometria de fluxo - Para avaliar se alterações na função de leucócitos em pacientes com neoplasias ovarianas estão relacionadas a alterações na expressão de receptores para quimiocinas (CXCR1 e CXCR2) ou moléculas de adesão (CD11b), envolvidos na migração celular, os níveis destas proteínas serão determinados por citometria de fluxo. Amostras de sangue total (2 ml)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009

PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

serão colocadas em 7 tubos de FACs. Os tubos 1, 2, 3 e 4 serão considerados como controle, sendo o primeiro constituído por células não marcadas e os demais por células marcadas por isotipo IgG2b (1 µl) conjugado a diferentes fluorocromos (FITC, PE e PECy5). Nos tubos 5, 6 e 7 serão colocados 1 µl dos anticorpos específicos (anti-CXCR1, anti-CXCR2 e anti-CD11b). As amostras contendo as células serão incubadas (30 min, temperatura ambiente) e a seguir fixadas com paraformaldeído 4% (diluído em PBS, 300 µl) e adicionado tampão de lise. Deve-se agitar, dar pausa de 3 a 5 min e centrifugar as amostras (400g, 10 min). Os sobrenadantes serão desprezados e o procedimento repetido por até 2 vezes. Em seguida as células serão lavadas com PBS (400 g, 10 min) e as amostras ressuspensas com paraformaldeído 4% (150 µl). A análise das células deverá ser realizada até o prazo máximo de 24 h. Os resultados serão expressos em intensidade de fluorescência e número de neutrófilos (porcentagem e absoluto).

Análise estatística - Os dados serão analisados pelo *GraphPad Instat software*. De acordo com a distribuição (teste de Kolmogorov-Smirnov), os resultados serão expressos em médias \pm EPM ou medianas e percentis. Os resultados entre os grupos não pareados (neoplasias benignas e malignas) serão comparados através de teste t ou Mann-Whitney, em caso de distribuição normal ou não, respectivamente. Os grupos pareados (pacientes pré e pós-tratamento) serão comparados através de teste t pareado ou Wilcoxon, em caso de distribuição normal ou não, respectivamente. A avaliação dos fatores prognósticos será realizada pelo teste do qui-quadrado, com nível de significância menor que 0,05. No estudo imunohistoquímico, a concordância entre dois observadores será realizada 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). As diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

6. ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES

Os setores de Patologia Especial, Laboratório do IPON (Instituto de Pesquisa em Oncologia) e Laboratório da disciplina de Farmacologia dispõem de infra-estrutura para a realização do estudo imunohistoquímico e das dosagens de citocinas e óxido nítrico.

7. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

O único desconforto devido à pesquisa poderá ser causado pela coleta de sangue, o que será minimizado por ser feito por profissional habilitado; o restante do material será do próprio cisto retirado durante o procedimento cirúrgico. A perda de confidencialidade será prevenida pela utilização de números e/ou letras para identificação dos casos. Os benefícios são consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico.

8. RETORNO DE BENEFÍCIOS PARA O SUJEITO E/OU PARA A COMUNIDADE

Espera-se encontrar aumento local e sistêmico das citocinas padrão TH2 e NO em pacientes com neoplasias malignas e, entre estas, em pacientes com parâmetros clínico-patológicos que sugerem pior prognóstico. Em pacientes com neoplasias malignas deve ocorrer redução na função fagocítica de neutrófilos e possivelmente redução na expressão dos receptores de quimiocinas.

9. JUSTIFICATIVA DE SUSPENSÃO TERAPÊUTICA (“Wash out”) – Não pertinente.

10. JUSTIFICATIVA DO USO DE PLACEBO – Não pertinente.

11. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA

1. Material de consumo: lâminas de vidro e lamínulas (R\$300,00), cartuchos para impressão (R\$370,00), papel sulfite (R\$65,00), anticorpos primários (R\$14.725,00), outros anticorpos necessários para imunohistoquímica e ELISA (R\$3.840,00), zimosan (1g=R\$100,00), custos operacionais (R\$700,00)

2. Equipamentos: micrótomo (R\$8.000,00), microscópio binocular de luz comum (R\$20.000,00), câmara fotográfica digital (R\$1.500,00), centrífuga (R\$5.000,00), computador e softwares para processamento de dados e imagens (R\$2.600,00), impressora (R\$600,00), freezer (R\$2.500,00), geladeira (R\$1.800,00).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM NEOPLASIAS OVARIANAS

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 08-07-2009

PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

Observação: Todos os equipamentos já se encontram disponíveis nas Disciplinas de Patologia Especial, Farmacologia e Ginecologia e Obstetrícia - IPON. Os materiais de consumo serão financiados por recursos obtidos pela aprovação no Edital Universal da FUNEPU 2009.

12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

Salário de professor adjunto.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO

O consentimento livre e esclarecido será obtido no momento da internação pré-cirúrgica pelo aluno da pós-graduação que está participando do estudo.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES

PARECER DO CEP: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 30-10-2009

Prof. Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora