

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

CID ALMEIDA DE LIMA

AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS NO ESTROMA
PERITUMORAL DE NEOPLASIAS EPITELIAIS
DE OVÁRIO

UBERABA - MG
2019

CID ALMEIDA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS NO ESTROMA PERITUMORAL DE
NEOPLASIAS EPITELIAIS DE OVÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

UBERABA - MG
2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

L697a Lima, Cid Almeida de
Avaliação de linfócitos no estroma peritumoral de neoplasias epiteliais
de ovário / Cid Almeida de Lima. -- 2019.
113 f.: il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini
Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

1. Ovários - Câncer. 2. Neoplasias ovarianas. 3. Linfócitos do interstício
tumoral. 4. Prognóstico. 5. Sobrevida. 6. Patologia cirúrgica. I. Nomelini,
Rosekeila Simões. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.11-006

CID ALMEIDA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS NO ESTROMA PERITUMORAL DE
NEOPLASIAS EPITELIAIS DE OVÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

14 de Junho de 2019

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Rosekeila Simões Nomelini
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Prof^ª. Dr^ª. Angélica Lemos Debs Diniz
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara
Universidade de São Paulo - USP

Prof^ª. Dr^ª. Marisa de Carvalho Borges
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

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

(Anderson Freire)

Dedico esta tese às mulheres que lutam diariamente contra o câncer de ovário. Mulheres que continuamente renovam suas forças na esperança e fé, acreditando que, estamos próximos à cura de tão mortal moléstia.

AGradeço...

Aos meus pais Vania e Divino, pela paixão que sempre demonstraram por mim e pela fé naquilo que eu acreditei durante todos esses anos de estudo, pelo carinho, amor, generosidade, companheirismo, pela dedicação e empenho. Por acreditar no meu sucesso incondicionalmente de tempestades que enfrentamos no caminho. Cada ida e vinda durante 3 anos deste processo que foi o doutorado um dia em uma cidade outro dia em outra.

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

Não existe vitória sem luta e essa vitória além de minha também é de vocês, obrigado por, apesar de serem tão diferentes, serem profundamente virtuosos! Eu amo muito vocês!

Ao meu marido Moisés Magela, por ser sempre presente em cada instante de nossa caminhada, por me estender a mão e me levar adiante, por ser tão doce e amoroso, me dando apoio, segurança, incentivo e me encorajando incansavelmente, por suportar a distância e dias longe. Estar do meu lado em toda essa caminhada foi fundamental para sua conclusão. Sou grato pelo amor e proteção.

À professora Dra. Rosekeila Simões Nomelini, pelo cuidado que sempre teve com este projeto, pela confiança em meu potencial, por me orientar durante 7 anos de pós-graduação, no mestrado e no doutorado, pela paciência, paciência e complacência. Pelo profissionalismo, seriedade e dedicação que sempre foram marcas do seu trabalho sendo espelho para mim e para tantos outros alunos e profissionais. Pela facilidade em solucionar

os problemas que surgiram durante a realização deste trabalho. Sou grato por cada hora dedicada exclusivamente ao nosso trabalho, por ser uma excepcional oncologista ginecológica.

*À minha amiga **Millena Prata Jammal**, por ser tão maravilhosa e afável, por me levar tão longe em tão pouco tempo, por sorrir e chorar comigo mesmo por coisas tão pequenas. Fomos muito felizes durante todos esses anos juntos! Obrigado por sempre ser um amor de pessoa.*

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

*À dra **Renata Margarida Etchebehere**, pela paciência em nos moldar diante das limitações impostas no decorrer do trabalho científico. Por abrir as portas do seu espaço de trabalho, confiando em nosso esforço e dedicação*

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo carinho e muito amor que amorteceu a saudade que sinto de estarem com vocês todos os dias. Obrigado por me acompanharem em cada etapa do decorrer deste trabalho. Sei que nosso amor é incondicional e vence todos os obstáculos. Eu amo vocês.

*À **Andréia, Maria de Fátima e Simone**, por estarem sempre dispostas à nos acolher e auxiliar na disciplina de Ginecologia e Obstetrícia.*

*À **Eliângela, Luzia e Cláudio**, por auxiliarem e nos apoiar durante o trabalho prático. Aos demais funcionários da Patologia Cirúrgica, por nos auxiliarem na elaboração desta tese; aos mestres da Pós-graduação pelos grandes ensinamentos; e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigado!*

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

Resumo

OBJETIVOS: O câncer de ovário é uma doença heterogênea, onde a inflamação crônica é um dos mecanismos centrais de sua patogênese. A localização, subtipo e densidade dos Linfócitos que Infiltram Tumores (TILs) são os principais determinantes desse valor prognóstico. Os objetivos do estudo foram avaliar a expressão de CD3, CD4, CD8 e CD20 no estroma peritumoral de neoplasias epiteliais ovarianas primárias benignas e malignas e relacioná-las a fatores prognósticos (níveis séricos de marcadores tumorais, tipo histológico, comprometimento de linfonodos, resposta à quimioterapia, sobrevida livre de doença, estadiamento e grau de diferenciação do tumor) no câncer de ovário.

PACIENTES E MÉTODOS: Foram avaliados 77 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Foi realizado estudo imuno-histoquímico para imunomarcadores (CD3, CD4, CD8 e CD20). A avaliação dos fatores prognósticos foi realizada pelo teste exato de Fisher. O nível de significância foi menor que 0,05.

RESULTADOS: Maior expressão de CD3 foi encontrada no estroma de neoplasias malignas primárias de ovário quando comparado ao grupo de neoplasias benignas, e maior expressão de células CD4 no estroma de neoplasias benignas em comparação ao câncer de ovário. Ao correlacionar a expressão de imunomarcadores com fatores prognósticos, houve maior expressão de células CD8 nas neoplasias malignas estromais ovarianas, com subtipo molecular II do modelo de carcinogênese ovariana epitelial, em relação ao tipo I. Na avaliação das metástases linfonodais, a ausência de marcação imunológica de células CD20 foi associada à ausência de metástases linfonodais.

CONCLUSÃO: O sistema imune desempenha um papel multifacetado e pode, em diferentes contextos, promover ou inibir o crescimento do tumor. O aumento da imunocoloração de CD3

é encontrado em neoplasmas malignas, enquanto o aumento da imunomarcção de CD4 está associado a neoplasias ovarianas benignas. A imunomarcção de CD8 foi maior nos tumores do tipo II, enquanto a ausência de imunomarcção de CD20 foi associada à ausência de metástases linfonodais.

Palavras-chave: câncer de ovário, linfócitos tumor infiltrantes, fatores prognósticos.

Abstract

OBJECTIVES: Ovarian cancer is a heterogeneous disease, where chronic inflammation is one of the central mechanisms of its pathogenesis. The location, subtype and density of Lymphocyte Tumor Infiltrators (TILs) are the main determinants of this prognostic value. The objectives of the study were to evaluate the expression of CD3, CD4, CD8 and CD20 in the peritumoral stroma of benign and malignant primary ovarian epithelial neoplasms and to relate them to prognostic factors (serum levels of tumor markers, histological type, lymph node involvement, response to chemotherapy, disease-free survival, staging, and degree of tumor differentiation) in ovarian cancer.

PATIENTS AND METHODS: We evaluated 77 patients treated at the Pelvic Mass Outpatient Clinic of the Department of Gynecology and Obstetrics / Institute of Oncology Research (IPON) of the Federal University of Triângulo Mineiro. Immunohistochemistry study for cytokines (CD3, CD4, CD8 and CD20) was performed. The evaluation of prognostic factors was performed using the Fisher's exact test. The significance level was less than 0.05.

RESULTS: A higher CD3 expression was found in the stroma of primary ovarian malignancies when compared to the group of benign neoplasms, and greater expression of CD4 cells in the stroma of benign neoplasms compared to ovarian cancer. By correlating the expression of cytokines with prognostic factors, there was a greater expression of CD8 cells in the stromal ovarian malignancies with molecular subtype II of the model of epithelial ovarian carcinogenesis compared to type I. In the evaluation of lymph node metastases, the absence of immuno-labeling of CD20 cells was associated with the absence of lymph node metastases.

CONCLUSION: The immune system plays a multifaceted role and can, in different contexts, promote or inhibit tumor growth. Increased immunostaining of CD3 is found in malignant neoplasms, while increased CD4 immunostaining is associated with benign ovarian

neoplasms. CD8 immunostaining was greater in type II tumors, while the absence of CD20 immunostaining was associated with the absence of lymph node metastases.

Key-words: ovarian cancer, tumor-infiltrating lymphocytes, prognostic factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Transferência de epitélio tubário normal do ovário, 2010 (KURMAN & SHIH, 2010).....	29
Figura 2: Frequência do estadiamento das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017, segundo os critérios da <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> - FIGO/2016.....	66
Figura 3: Frequência do Grau Histológico das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017, segundo os critérios da <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> - FIGO/2016.....	67
Figura 4: Frequência do Subtipo Molecular das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017, segundo os critérios da <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> - FIGO/2016.....	68
Figura 5: Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD3.....	72
Figura 6: Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD4.....	73
Figura 7: Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD8.....	74
Figura 8: Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD20.....	75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Classificação dos tumores ovarianos malignos. Adaptado de *World Health Organization Classification of Tumours*, 2003 (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003)..... 30
- Tabela 2** - Estadiamento do câncer de ovário maligno segundo a FIGO. *Adaptado de *The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer* (ZEPERNICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014)..... 38
- Tabela 3** - Variáveis quantitativas das pacientes com Neoplasia Maligna/Benigna de ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017..... 64
- Tabela 4** - Variáveis qualitativas das pacientes com Neoplasia Maligna/Benigna de ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017..... 65
- Tabela 5** - Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Benignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017..... 69
- Tabela 6** - Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017..... 70
- Tabela 7** - Diferenças na marcação tecidual estromal por imuno-histoquímica das citocinas entre neoplasias malignas e benignas de ovário das atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017..... 71
- Tabela 8:** Distribuição das leituras dos imuno-marcadores com imuno-marcação estromal, e correlações com o grau histológico, estadiamento, subtipo molecular, metástases em

linfonodos, fatores hematológicos (RNL/RPL), glicemia, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença das neoplasias malignas de ovário..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ADNEX - *Assessment of Different NEoplasias in the adneXa*

AFP - Alfa-Fetoproteína

ATPS-3 - Trietoxissililpropilamina

BRCA1 - Gene Supressor de Tumor *Breast Cancer 1*

BRCA2 - Gene Supressor de Tumor *Breast Cancer 2*

BSA - Albumina de Soro Bovino

CA 72.4 - Antígeno do Câncer 72.4

CA-125 - Antígeno do Câncer 125

CA-15.3 - Antígeno do Câncer 15.3

CA-19.9 - Antígeno do Câncer 19.9

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CD - *Cluster of Differentiation*

CD20 - *Cluster of Differentiation 20*

CD3 - *Cluster of Differentiation 3*

CD4 - *Cluster of Differentiation 4*

CD8 - *Cluster of Differentiation 8*

CEA - Antígeno Carcinoembrionário

CEO - Câncer Epitelial de Ovário

cm - Centímetro

DAB - Diaminobenzidina

DCs - Células Dendríticas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

GDF-15 - Fator de Diferenciação do Crescimento-15

HE4 - Proteína Humana 4 derivada do Epidídimo

IFN- γ - Interferón - γ

IL-10 - Interleucina - 10

IL-12 - Interleucina - 12

IL-13 - Interleucina - 13

IL-2 - Interleucina - 2

IL-3 - Interleucina - 3

IL-4 - Interleucina - 4

IOTA - *International Ovarian Tumour Analysis*

IPON - Instituto de Pesquisa em Oncologia

KIR-NK - *Natural Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors*

LDH - Lactato Desidrogenase

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MUC-16 - Mucina 16

NK - Células *Natural Killer*

NKT - Linfócitos T Natural Killer

Oct4 - Octamer - 4

PBS - Tampão Salino Fosfato

pH - Potencial Hidrogeniônico

RNL - Relação Neutrófilo Linfócito

RPL - Relação Plaqueta Linfócito

SLD - Sobrevida Livre de Doença

T CD20 - Linfócito T *Cluster of Differentiation 20*

T CD3 - Linfócito T *Cluster of Differentiation 3*

T CD4 - Linfócito T *Cluster of Differentiation 4*

T CD8 - Linfócito T *Cluster of Differentiation 8*

Th1 - Citocina Padrão *T helper 1*

Th2 - Citocina Padrão *T helper 2*

TILs - Linfócitos Tumor Infiltrantes

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral - α

Treg - Linfócito T regulatório

Tris-EDTA - Tris Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

U/mL - Unidade por Mililitro

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

β -hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO	25
1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS E PRÉ-DISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE OVÁRIO	26
1.3 ORIGEM DA NEOPLASIA OVARIANA	27
1.4 NEOPLASIA MALIGNA OVARIANA.....	29
1.4.1 Classificação molecular da neoplasia maligna ovariana	31
<i>1.4.1.1 Subtipo molecular Tipo I</i>	31
<i>1.4.1.2 Subtipo molecular Tipo II</i>	32
1.5 SOBREVIDA NA NEOPLASIA MALIGNA OVARIANA	33
1.6 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA.....	34
1.7 FATORES PROTETORES PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA	34
1.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE OVÁRIO	34
1.8.1 Ultrassonografia transvaginal	35
1.8.2 Marcadores tumorais	36
1.8.3 Análise patológica cirúrgica	37
1.9 RESPOSTA IMUNE NO CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO	40
1.9.1 Linfócitos T Reguladores (CD4)	41
1.9.2 Linfócitos que infiltram tumores “TILs” (CD3)	41
1.9.3 Linfócitos T citotóxicos (CD8)	42
1.9.4 Células <i>Natural Killer</i> (NK)	43
1.9.5 Linfócitos B (CD20)	44
1.10 USO DO GRUPAMENTO DE DIFERENCIAÇÃO (CD) PARA DETECÇÃO DE LINFÓCITOS.....	46

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	47
2.1 JUSTIFICATIVA	48
2.2 HIPÓTESES	48
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 PACIENTES	52
4.1.1 Critério de indicação de laparotomia exploradora	52
4.1.2 Caracterização dos grupos	53
4.1.3 Critérios de inclusão	53
4.1.4 Critérios de exclusão	53
4.2 ELABORAÇÃO DO BANCO DE DADOS	54
4.2.1 Perfil das pacientes	54
4.2.2 Exame ultrassonográfico	54
4.2.3 Exames laboratoriais	54
4.2.4 Diagnóstico Anátomo patológico	55
4.2.5 Relações neutrófilo/linfócito (RNL) e plaqueta/linfócito (RPL)	55
4.2.6 Resposta à quimioterapia	55
4.2.7 Dados de sobrevida	56
4.3 MÉTODOS.....	56
4.3.1 Análise anátomo-patológica	56
4.3.2 Análise imuno-histoquímica	57
4.3.3 Leitura das lâminas de imuno-histoquímica	59
4.3.4 Análise estatística	60
4.3.5 Estruturação do banco de dados	60
4.3.6 Redação do texto	61

5. RESULTADOS	62
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	99

1. Introdução

1 1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO

2 O câncer de ovário é de difícil diagnóstico, sendo a principal causa de morte entre os
3 tumores ginecológicos, devido a uma sintomatologia inespecífica e a falta de métodos de
4 diagnóstico eficazes, o que dificulta a detecção precoce dessa neoplasia (JIA *et al.*, 2014).

5 A neoplasia maligna de ovário tem as menores taxas de sobrevivência entre os
6 tumores ginecológicos, por ser predominantemente diagnosticada nos estádios mais
7 avançados da doença (estádios III e IV) (ALQASEMI *et al.*, 2012).

8 Apesar dos sintomas do câncer de ovário serem inespecíficos no início da doença,
9 estudos indicam que algumas mulheres experimentam inespecíficos e persistentes sintomas
10 como dor lombar, edema em membros inferiores, dor pélvica intermitente e do tipo cólica, dor
11 abdominal, hiporexia e/ou saciedade precoce, frequência ou urgência urinária, principalmente
12 nos meses antecedentes ao diagnóstico. Segundo a *American Cancer Society*, o sinal da
13 presença de câncer de ovário mais comum entre as pacientes diagnosticadas nos Estados
14 Unidos da América, é o inchaço abdominal, causado pela acumulação de líquido na cavidade
15 peritoneal (ascite) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Aproximadamente 5 a 10%
16 dos tumores em estadiamento aparentemente inicial já apresentam metástases em linfonodos
17 aórticos ou pélvicos (MURTA *et al.*, 1995).

18 Cerca de 295.414 novos casos foram estimados em todo o globo terrestre em 2018,
19 com aproximadamente 184.799 mortes. Em todo o mundo ocupa o 15º lugar na classificação
20 de incidência de morte por câncer (GLOBOCAN, 2019). Nos Estados Unidos da América, o
21 câncer de ovário é responsável por cerca de 2,5% de todos os cânceres entre as mulheres,
22 acarretando 5% de mortes por câncer em geral nesta população (AMERICAN CANCER
23 SOCIETY, 2019).

1 Apesar de sua incidência vir baixando cerca de 1% ao ano desde meados de 1970 em
2 mulheres com menos de 65 anos de idade, somente a partir da década de 1990 houve queda na
3 incidência da doença em mulheres mais velhas. Estudos estatísticos mostram que de 2007 a
4 2016, a taxa de mortalidade diminuiu em cerca de 2% ao ano. Contudo, apesar destes estudos
5 mostrarem uma queda no número de incidência e morte pela doença, mais mulheres morrem
6 de câncer de ovário do que de todos os outros tumores ginecológicos juntos (LEWIS *et al.*,
7 2018, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

8 No Brasil a estimativa de novos casos de câncer de ovário é de 6.150 para cada ano
9 do biênio 2018-2019, com aproximadamente 3.536 mortes, sendo responsável por 3% da
10 ocorrência entre os tumores que acometem as mulheres, enquadrando a oitava causa de morte
11 por tumores ginecológicos no país (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 2019).

12 1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS E PRÉ-DISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE OVÁRIO

13 Cerca de 90% dos cânceres de ovário são esporádicos, ou seja, não apresentam fator
14 de risco reconhecido. Cerca de 10% apresentam um componente genético ou familiar que leva
15 a predisposição à doença (RISCH, 1998).

16 As mulheres que possuem mutações deletérias nos genes BRCA1 ou BRCA2 ou que
17 possuem mãe ou irmã com mutação genética representam o subgrupo com maior
18 probabilidade de desenvolvimento do câncer de ovário (HORIUCHI *et al.*, 2003).

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

1 Por volta dos 70 anos de idade o risco cumulativo médio para portadoras de mutação
2 em BRCA1 e BRCA2 desenvolvimento no câncer de ovário é de 59% e 16,5%,
3 respectivamente (MAVADDAT. *et al.*, 2013).

4 As proteínas produzidas pelos genes BRCA1 e BRCA2 são consideradas guardiãs do
5 genoma, e desempenham papéis importantes na sinalização de danos no DNA, ativação de
6 reparo do DNA, indução de apoptose, e o monitoramento dos pontos de controle do ciclo
7 celular (BOULTON, 2006).

8 Células que não possuem o gene BRCA funcional mostram um aumento na
9 aneuploidia, amplificação centrossômica e aberrações cromossômicas, que as tornam
10 susceptíveis a novas mutações adicionais (ROSEN *et al.*, 2003).

11 BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumores que são herdados de maneira
12 autossômica dominante (CHOBANIAN & DIETRICH, 2008). Portanto, a história familiar é o
13 fator de risco isolado mais importante para o desenvolvimento do câncer de ovário
14 (REBBECK *et al.*, 2002).

15 1.3 ORIGEM DA NEOPLASIA OVARIANA

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

19 Estudos demonstraram que as tubas uterinas, ao serem cuidadosamente examinadas,
20 confirmam que pequenos focos de carcinomas tubários podem invadir o epitélio ovariano tanto
21 em mulheres com uma predisposição genética para o desenvolvimento de câncer de ovário,

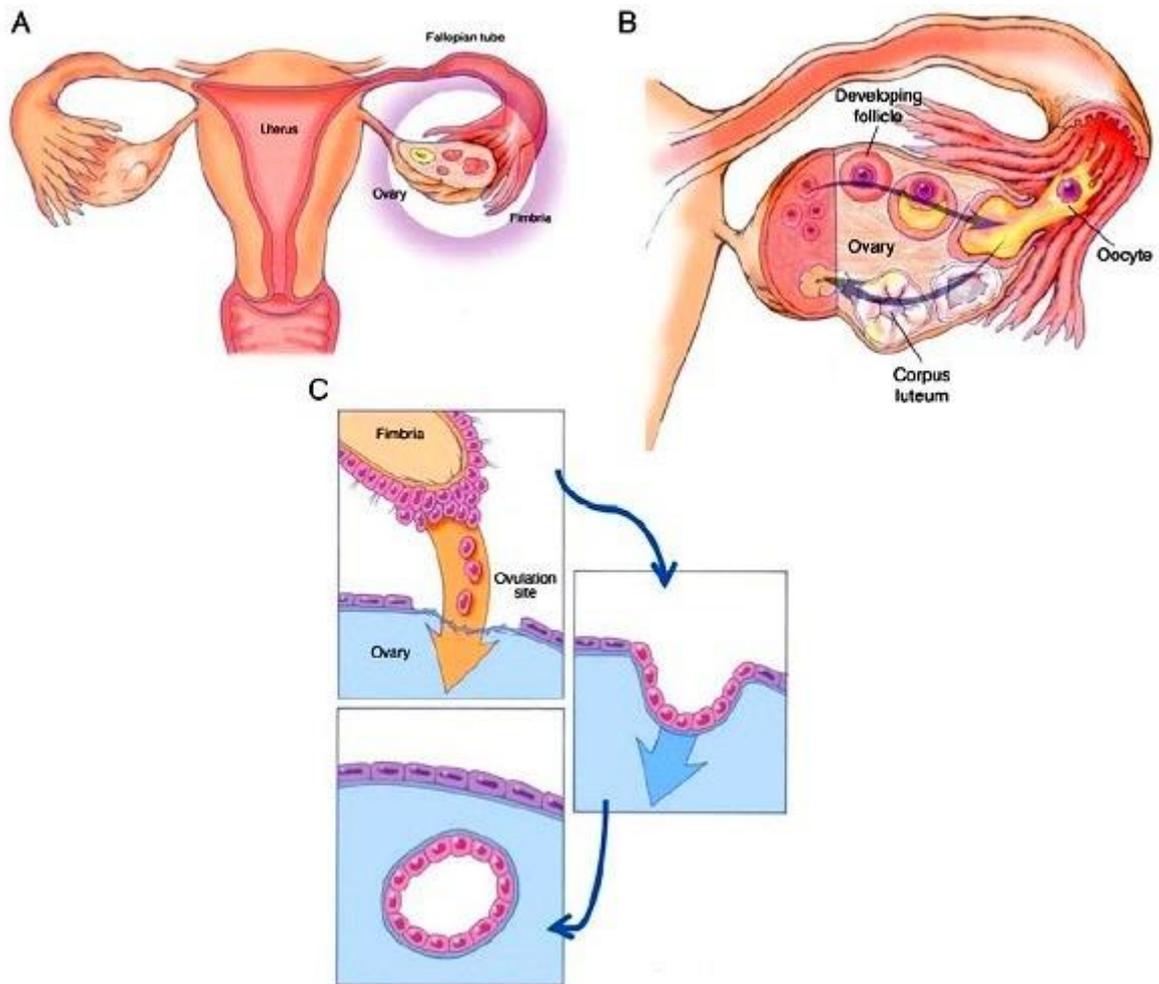
1 como também naquelas sem mutações conhecidas no gene BRCA (PRZYBYCIN *et al.*, 2010),
2 sugerindo uma das teorias atuais da ocorrência da doença.

3 Ainda em outros estudos, foi possível verificar que a presença dos tumores serosos
4 estava quase sempre detectados nas fímbrias e tem sido proposto que a primeira mudança
5 neoplásica começaria nas células do tipo secretoras (KINDELBERGER *et al.*, 2007). Para
6 alguns autores, o contato incessante das fímbrias à superfície do ovário favorece o
7 desprendimento das células tumorais originalmente encontradas nas tubas (geralmente
8 carcinomas serosos de alto grau) para o epitélio ovariano lesionado pela liberação do oócito, o
9 que ocasionaria a adesão dessas células tumorais no local específico da lesão ovariana, e como
10 fator agravante, a eliminação dessas células ficaria prejudicada pelo sistema imune já que
11 naquele local se encontram uma grande concentração de fatores inflamatórios relacionados à
12 lesão fisiológica do mesotélio ovariano, impossibilitando uma atuação direta das células
13 efectoras do sistema imune (READE *et al.*, 2014).

14 A implantação das células cancerosas das fímbrias leva a formação de um cisto de
15 inclusão no ovário, esse cisto por sua vez pode vir a se desenvolver e, a partir daí, levar ao
16 desenvolvimento do carcinoma seroso de alto grau, dando início ao câncer epitelial de ovário
17 (KURMAN & SHIH, 2010) (Figura 1).

18 Depois de serem submetidas à transformação maligna, estas células originadas das
19 tubas e implantadas no ovário espalham-se rapidamente por toda a cavidade peritoneal. Já, os
20 tumores de células endometrioides e tumor de células claras do ovário parecem surgir em
21 associação com a endometriose, o que sugere que o revestimento endometrial, através de
22 menstruação retrógrada, é a fonte de muitos tumores do tipo I. Dada estas teorias da patogênese
23 do câncer epitelial do ovário, a cirurgia ginecológica pode ser antecipada evitando o
24 aparecimento posterior do câncer de forma diferente, dependendo do tipo de cirurgia e do tipo
25 de câncer (TERADA *et al.*, 2016, VISVANATHAN *et al.*, 2018).

1 **Figura 1:** Transferência de epitélio tubário normal do ovário, 2010 (KURMAN & SHIH, 2010)



2 **Figura 1 - A:** relação anatômica da tuba uterina entre o ovário no momento da ovulação. Fímbrias
 3 envolvendo o ovário. **B:** ovulação. A superfície do ovário rompe com a expulsão e transferência do oócito à
 4 fímbria. As fímbrias estão em contato íntimo com o ovário no local da ruptura. **C:** as células epiteliais das
 5 fímbrias são desalojadas e implantam-se sobre a superfície desnuda do ovário, resultando na formação de
 6 um cisto de inclusão. Fonte: KURMAN & SHIH, 2010.

7 1.4 NEOPLASIA MALIGNA OVARIANA

8 Os tumores derivados do epitélio podem ser classificados em invasores e não-
 9 invasores (*borderline*). Os tumores *borderline* representam 20% dessa categoria e estão

1 associados a melhor prognóstico, porém os tumores *borderline* serosos com característica
 2 micropapilar apresentam uma maior chance de recidiva comparado aos mesmos sem
 3 características micropapilar (MIRONOV *et al.*, 2007).

4 Os tumores malignos primários do ovário podem ser classificados em três grupos:
 5 tumores epiteliais-estromais; tumores dos cordões sexuais-estromais; e tumores de células
 6 germinativas (Tabela 1) (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003).

Tabela 1 - Classificação dos tumores ovarianos malignos. Adaptado de *World Health Organization Classification of Tumours*, 2003 (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003).

Tumores ovarianos		
Tumores da superfície	Tumores dos cordões	Tumores das células
epitelial-estromal	sexuais-estromais	germinativas
Tumores Serosos	Tumor de células da Granulosa	Disgerminoma
Tumores Mucinosos	Tumor de células de Sertoli- Leydig	Coriocarcinoma
Tumores Endometrioides	Tumor de células Esteroidais	Carcinoma embrionário
Tumor de Células Claras		Teratoma Imaturo
Tumor de Células Transicionais		Tumor do seio endodérmico
Tumor indiferenciado		

Fonte: TAVASSOLI & DEVILEE, 2003.

1 1.4.1 Classificação molecular da neoplasia maligna ovariana

2 Na última década, pesquisadores vêm demonstrando uma melhor classificação dos
3 tumores ovarianos através de estudos de perfil genético, de suas características patológicas e
4 moleculares, associados a observações clínicas de forma que têm disposto um novo norte para
5 as habituais classificações dadas pelos patologistas (READE *et al.*, 2014). Dentro desse
6 contexto, Kurman & Shih (2011), propuseram um modelo dualista que de forma clara
7 separaram o câncer epitelial de ovário em 2 grupos (tipo I e II) com os principais tipos
8 histológicos. Dessa forma, os tumores tipo I são compostos de carcinomas serosos de baixo
9 grau, carcinoma endometriode de baixo grau, carcinoma de células claras e carcinomas
10 mucinosos que se desenvolvem de forma gradual a partir de lesões precursoras bem
11 estabelecidas, tais como tumores conhecidos como limítrofes (*borderline*) e endometriose.

12 1.4.1.1 Subtipo molecular Tipo I

13 Os tumores tipo I normalmente apresentam-se como grandes massas que estão
14 confinadas a um ovário (estádio IA), possuem classificação histológica bem definida, são em
15 sua maioria indolentes e tem um bom prognóstico. Possuem característica de serem
16 relativamente geneticamente mais estáveis quando comparados aos tumores do tipo II e
17 geralmente exibem uma variedade de mutações somáticas de sequencias que incluem os
18 genes: KRAS, BRAF, ERBB2, CTNNB1, PTEN PIK3CA, ARID1A, e PPPR1A. Os tumores
19 tipo I raramente possuem alguma mutação ou disfunção da proteína TP53 (KURMAN &
20 SHIH, 2016).

1 1.4.1.2 Subtipo molecular Tipo II

2 Em contraste, os tumores do tipo II para serem classificados dependem do padrão
3 histológico dominante, e são compostos por carcinoma seroso de alto grau (subtipo mais
4 comum de carcinoma seroso), carcinoma endometriode de alto grau, tumores malignos
5 mesodermis mistos (carcinossarcomas) e carcinomas indiferenciados de alto grau, que se
6 apresentam em estádios avançados (estádios II-IV) em mais de 75% dos casos. Crescem
7 rapidamente e são altamente agressivos com alto potencial metastático, suas diferenças
8 morfológicas são mais sutis, tumores tipo II exibem padrões papilar, glandular e sólido o que
9 confunde os patologistas. Tumores do tipo II, dos quais o carcinoma seroso de alto grau é o
10 mais frequente, são altamente cromossomicamente instáveis e possuem mutações da proteína
11 TP53 em acima de 95% dos casos. Eles raramente exibem as mutações encontradas nos
12 tumores do tipo I e se desenvolvem a partir de carcinomas intraepiteliais localizados nas
13 fímbrias da tuba uterina (KURMAN & SHIH, 2016).

14 O deslocamento do epitélio tubário normal a partir das fímbrias, implantam no local
15 de ruptura em que a ovulação ocorreu, resultando na formação de um cisto de inclusão que
16 pode ser submetido à transformação maligna. Assim, os tumores podem desenvolver cistos
17 serosos de inclusão, como foi inicialmente pensado, por um processo de implantação de
18 tecido tubário (tecido Mülleriano) e não através de um processo de metaplasia do epitélio da
19 superfície do ovário (tecido mesotelial). Segundo a literatura, há evidências crescentes de que
20 o tipo I e tumores ovarianos do tipo II desenvolvem-se de forma independente ao longo de
21 diferentes percursos moleculares, e que ambos os tipos se desenvolvem fora do ovário
22 envolvendo-o em segundo plano, caso este conceito seja confirmado levará à conclusão de
23 que a fonte dos tumores ovarianos são gonadais, estromais ou tumores de células
24 germinativas. Essas conclusões acarretariam em novas abordagens clínicas onde ao deslocar

1 os eventos iniciais da carcinogênese do ovário para a tuba uterina em vez do ovário,
2 abordagens de prevenção, por exemplo, salpingectomia com conservação ovariana, que nunca
3 foi seriamente considerada no passado, poderia desempenhar um papel importante na redução
4 da comorbidade desta doença enquanto ao mesmo tempo preservando a função hormonal e
5 fertilidade das pacientes (LABIDI-GALY *et al.*, 2017, VISVANATHAN *et al.*, 2018).

6 Cerca de 50% dos carcinomas serosos de alto grau apresentam disfunção de BRCA,
7 quer por mutação, ou inativação da expressão desses genes e os seus genes a jusante através
8 de metilação do promotor (SENTURK *et al.*, 2010). Inativação de BRCA não tem sido
9 relatada em tumores do tipo I (KURMAN & SHIH, 2016).

10 1.5 SOBREVIDA NA NEOPLASIA MALIGNA OVARIANA

11 A sobrevida em 5 anos para pacientes diagnosticadas em estágio I varia entre 80 e
12 90%, enquanto que, para pacientes em estágio III e IV, varia de 5 a 50%. Atualmente,
13 aproximadamente, 60 a 65% das pacientes, encontram-se em estágio III no momento do
14 diagnóstico, justificando a elevada letalidade dessa neoplasia (MIRONOV *et al.*, 2007).

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

1 1.6 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

2 Nuliparidade, ausência de amamentação, menopausa tardia, parentes diretos (mãe ou
3 irmã) com câncer de ovário ou câncer de mama (VRABIE *et al.*, 2008), sobrepeso ou
4 obesidade (DOTLIĆ *et al.*, 2011), são fatores de risco para a ocorrência de neoplasia maligna
5 ovariana, sendo sua maior incidência em mulheres acima dos cinquenta anos de idade
6 (VRABIE *et al.*, 2008, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

7 1.7 FATORES PROTETORES PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

8 Em contrapartida aos fatores de risco, existem fatores que limitam, ou que diminuem
9 o risco da doença, tais como: a inibição ou parada da ovulação habitual, seja por gravidez ou
10 contracepção oral (CLARKE-PEARSON, 2009, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019),
11 por dez ou mais anos, que reduz em até 50% a chance de desenvolver o câncer (RISCH *et al.*,
12 1983); aumento no tempo de lactação; multiparidade (CLARKE-PEARSON, 2009), ou
13 cirurgia prévia de histerectomia ou laqueadura tubária (SCHILDKRAUT & THOMPSON,
14 1988).

15 1.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE OVÁRIO

16 Os métodos mais utilizados para diagnosticar os tumores ovarianos são: marcadores
17 sorológicos tumorais que podem apresentar positividade tanto no soro, quanto em ascite de
18 pacientes com tumores epiteliais malignos e benignos de ovário (CHERCHI *et al.*, 2002).

1 Além do uso da ultrassonografia transvaginal que auxilia na diferenciação entre
2 tumores neoplásicos e não neoplásicos (TAVARES-MURTA *et al.*, 2004), associado ao
3 *Color Doppler* que pode ser utilizado na avaliação das massas ovarianas e na diferenciação
4 entre benignidade e malignidade pela observação do índice de resistência e índice de
5 pulsatilidade do fluxo sanguíneo nas regiões tumorais (ZHANG & ZHANG, 2015).

6 **1.8.1 Ultrassonografia transvaginal**

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

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

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

1 seguintes variáveis: 1. Quatro variáveis clínicas: idade, nível sérico de CA-125, história
2 familiar de câncer de ovário e tipo de centro médico (centro de oncologia contra outros
3 hospitais); 2. Seis variáveis de ultrassom: diâmetro máximo da lesão, proporção de tecido
4 sólido (sendo, o diâmetro máximo do maior componente sólido dividido pelo diâmetro
5 máximo da lesão), a presença de mais de 10 lóculos císticos, o número de projeções papilares,
6 presença de sombras acústicas e presença de ascite.

7 Segundo os pesquisadores o novo modelo ADNEX otimiza a abordagem das
8 mulheres com alguma massa anexial e a adoção do protocolo pelo ultrassonografista e a
9 interpretação dos resultados pelo oncologista são cruciais para a determinação do diagnóstico
10 e tratamento das portadoras de neoplasia ovariana, além disso, o ADNEX oferece excelente
11 discriminação entre tumores benignos e malignos, podendo esse modelo prever o tipo de
12 malignidade (VAN CALSTER *et al.*, 2014).

13 O conhecimento do tipo específico de doenças anexiais, antes da cirurgia é altamente
14 susceptível, melhorando a triagem do paciente, e também torna possível o favorecimento do
15 tratamento. Este, por sua vez, pode reduzir a morbidade e levar a um aumento da sobrevida
16 em diferentes tipos de tumores malignos do ovário (PEREIRA *et al.*, 2018).

17 **1.8.2 Marcadores tumorais**

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

21 Um marcador tumoral pode ser produzido pelo próprio tumor, em resposta à
22 presença do câncer (MATTOS *et al.*, 2005). Testes para marcadores tumorais podem ser

1 realizados isoladamente ou associados com exames de imagem, para detectar e diagnosticar
2 alguns tipos de câncer (REIS, 2005).

3 Os níveis séricos dos marcadores tumorais devem refletir com precisão a evolução
4 clínica e a regressão da doença, e a normalização dos seus níveis deve estar associada à cura
5 (REIS, 2005). Devem ser sensíveis e específicos e ainda apresentar níveis proporcionais ao
6 tamanho do tumor, no estabelecimento do prognóstico e na detecção precoce de recorrência
7 (EDGELL *et al.*, 2010).

8 Os marcadores tumorais séricos de rotina utilizados na prática clínica para a
9 avaliação de neoplasias ovarianas são: Antígeno Carcinoembrionário (CEA), CA-125, CA-
10 19.9, CA-15.3, Alfa-fetoproteína (AFP) e Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β (β -
11 hCG).

12 Estudos mostram que outros marcadores podem ser usados para auxiliar no
13 diagnóstico das neoplasias ovarianas tais como: Proteína Humana 4 derivada do Epidídimo
14 (HE4) (MOORE *et al.*, 2009), Fator de Diferenciação do Crescimento-15 (GDF-15) (LIMA *et*
15 *al.*, 2018), CA 72.4 (MOR *et al.*, 2005), Octamer - 4 (Oct4) (ZHANG *et al.*, 2010), Lactato
16 Desidrogenase (LDH) (SIMAGA *et al.*, 2005) e Progranulina (DIAZ-CUETO *et al.*, 2012).

17 **1.8.3 Análise patológica cirúrgica**

18 Além dos métodos de triagem utilizados na detecção dos tumores ovarianos, a
19 análise cirúrgica/patológica norteia o diagnóstico e também o estadiamento dos tumores
20 malignos de ovário. Dentro deste contexto a *International Federation of Gynecology and*
21 *Obstetrics* (FIGO) determina requisitos que o cirurgião oncológico aplica durante a

- 1 abordagem cirúrgica para a remoção das massas anexiais. (ZEPERNICK & MEINHOLD-
 2 HEERLEIN, 2014).
- 3 A relação dos estadiamentos das neoplasias ovarianas está descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Estadiamento do câncer de ovário maligno segundo a FIGO. *Adaptado de *The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer* (ZEPERNICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

Estádio I – Tumor limitado aos ovários ou *Trompa(s) de Falópio*^a

Estádio IA: Tumor limitado a um ovário ou Trompa(s) de Falópio, não há células malignas na ascite ou lavado peritoneal. Sem tumor na superfície do ovário ou Trompa(s) de Falópio, com cápsula intacta

Estádio IB: Tumor limitado aos dois ovários ou Trompas de Falópio, não há células malignas na ascite ou lavado peritoneal. Sem tumor na superfície dos ovários ou Trompas de Falópio, com cápsula intacta

Estádio IC: Tumor limitado a um ou ambos os ovários ou Trompa(s) de Falópio, com alguma das alterações:

IC1: Rompimento cirúrgico intra-operatório do tumor

IC2: Cápsula rota antes da cirurgia ou na superfície ovariana ou da Trompa(s) de Falópio

IC3: Células malignas na ascite ou lavado peritoneal

Estádio II – Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou Trompas de Falópio com extensão pélvica (abaixo cavidade pélvica) ou *câncer peritoneal primário*^b

Estádio IIA: Extensão e/ou metástase para útero e/ou Trompa(s) de Falópio e/ou Trompa(s) de Falópio e/ou ovários

Estádio IIB: Extensão para outros tecidos intra-peritoneais pélvicos.

Estádio III – Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou Trompas de Falópio, ou câncer

peritoneal, confirmação histológica ou citológica de propagação para o peritônio fora da pelve e/ou metástase para os linfonodos retroperitoneais

Estádio IIIA1: Somente linfonodos retroperitoneais positivos (comprovado citologicamente ou histologicamente)

IIIA1(i): Metástase de até 10 mm em sua maior dimensão

IIIA1(ii): Metástase maior que 10 mm em sua maior dimensão

Estádio IIIA2: Envolvimento peritoneal microscópico extra-pélvico (acima da cavidade pélvica), com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos

Estádio IIIB: Metástase peritoneal macroscópica além da pelve até 2 cm em sua maior dimensão, *com ou sem metástase para os linfonodos retroperitoneais* (inclui extensão do tumor para cápsula do fígado e baço, sem envolvimento do parênquima de qualquer órgão)

Estádio IIIC: Metástase peritoneal macroscópica além da pelve acima de 2 cm em sua maior dimensão, com ou sem metástases para os linfonodos retroperitoneais (inclui extensão do tumor para cápsula do fígado e baço, sem envolvimento do parênquima de qualquer um dos órgãos)

Estádio IV – Metástases à distância excluindo metástases peritonais

Estádio IVA: O derrame pleural com citologia positiva

Estádio IVB: Metástases para o parênquima e metástases para órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal)^c

^aNão é possível ter o câncer peritoneal no estágio I

^bAderências densas com células tumorais comprovadas histologicamente justificam a atualização de tumores do Estádio I para Estádio II.

^cMetástases extra-abdominais incluem infiltração intestinal transmural e depósito umbilical.

*O sistema de estadiamento do câncer de ovário é estabelecido pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) baseando-se no resultado obtido durante o ato cirúrgico. Fonte: ZEPERNICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014.

1 1.9 RESPOSTA IMUNE NO CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO

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

9 Por outro lado existem, células efetoras da resposta imunológica antitumoral que
10 participam diretamente na apresentação dos antígenos tumorais e/ou no ataque a essas células,
11 esse grupo inclui os linfócitos (TILs - Linfócitos Tumor Infiltrantes): T CD4+, T CD8+ (*o*
12 *símbolo “+” refere-se às células imunologicamente ativadas*), linfócitos T CD3+, linfócitos T
13 CD20+ e linfócitos T Natural Killer (NKT); células *Natural Killer* (NK) e Células Dendríticas
14 (DCs) (KNUTSON *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; IGLESIA *et al.*, 2014; COOSEMANS
15 *et al.*, 2015).

16 Há várias teorias que descrevem o funcionamento e a relação do sistema
17 imunológico sobre as células tumorais e suas respectivas moléculas sinalizadoras, contudo,
18 não é possível ainda descrever em detalhes o papel da resposta imune frente ao câncer
19 epitelial de ovário, por existirem atuações distintas das células imunes como os linfócitos T
20 onde pode-se observar comportamentos diferentes de uma mesma célula, levando à
21 proliferação ou inibição do crescimento tumoral (KNUTSON *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*,
22 2003).

1 **1.9.1 Linfócitos T Reguladores (CD4)**

2 Tem sido descrito na literatura que algumas células como os linfócitos T regulatórios
3 (Treg) CD4+ CD25+ FOXP3+ atuam como células imunossupressoras de tumores
4 aumentando a tolerância do sistema imune à auto-antígenos (RUDENSKY, 2011), podendo
5 alterar a resposta dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) administrados nas pacientes em
6 tratamento contra o câncer de ovário, podendo ainda levar à supressão de células que
7 naturalmente atacariam os tecidos tumorais como os linfócitos T CD4+ *in vivo* e *in vitro*
8 (KNUTSON *et al.*, 2003).

9 Os linfócitos T CD4+ desempenham um papel ambivalente na resposta anti-tumoral.
10 A resposta citotóxica anti-tumoral é assegurada pelo conjunto de citocinas liberadas por essas
11 células que recebem o nome de perfil Th1, enquanto que a função de progressão tumoral se dá
12 a partir do momento em que essas células liberam citocinas de perfil Th2. A resposta imune
13 de perfil Th1 é acompanhada pela produção das seguintes citocinas: Interleucina - 2 (IL-2);
14 Interleucina - 12 (IL-12); Interferón - γ (IFN- γ); Fator de necrose tumoral - α (TNF- α) e a
15 resposta de perfil Th2 pela produção das citocinas: Interleucina - 3 (IL-3); Interleucina - 4
16 (IL-4); Interleucina - 10 (IL-10) e Interleucina - 13 (IL-13) (LUKESOVA *et al.*, 2015).

17 Segundo alguns pesquisadores as citocinas de perfil Th1 são responsáveis pelo
18 fortalecimento da resposta imune tumoral que em consequencia levam ao favorecimento do
19 prognóstico das pacientes com CEO (MILLIKEN *et al.*, 2002).

20 **1.9.2 Linfócitos que infiltram tumores “TILs” (CD3)**

21 Os TILs CD3 são a principal população celular situada no local do tumor, bem como
22 no sangue periférico de pacientes com carcinoma ovariano. Se infiltram no tumor através da

1 atração de quimiocinas produzidas por células cancerosas que também regulam a migração de
2 outros linfócitos para o estroma tumoral. A maioria dos tumores ovarianos têm mostrado que
3 a presença dessa classe celular é um fator independente de prognóstico favorável contra a
4 doença (LUKESOVA *et al.*, 2015).

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

13 **1.9.3 Linfócitos T citotóxicos (CD8)**

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

22 Os linfócitos T CD8+ são responsáveis por induzir as células tumorais do câncer
23 epitelial de ovário à apoptose pelo reconhecimento de antígenos tumorais apresentados por

1 moléculas de MHC, podendo reconhecer proteínas com 8 a 10 aminoácidos. Esses linfócitos
2 são muito importantes na resposta imune frente aos tumores ovarianos, no entanto, por si só
3 não são suficientes para a erradicação do câncer principalmente por serem imunologicamente
4 influenciados pela ativação de linfócitos Treg (KNUTSON *et al.*, 2003)

5 **1.9.4 Células *Natural Killer* (NK)**

6 Outras células importantes na resposta imune aos tumores ovarianos são as células
7 NK que além de terem propriedades de indução à morte celular podem apresentar antígenos.
8 As células NK são linfócitos granulares grandes que não possuem os marcadores de superfície
9 de IgG nem de células T (CD3- CD19- CD56+). A atividade citolítica das células NK é
10 inibida através da interação do receptor de células expressa KIR-NK com moléculas MHC de
11 classe I. Essas células reconhecem tumores de uma forma não restrita ao MHC (MORETTA
12 *et al.*, 2002).

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

20 A MUC-16 (CA-125) protege as células tumorais do ovário do ataque do sistema
21 imunológico, promovendo o crescimento do tumor. A presença dessa mucina viabiliza um
22 método de fuga importante observado nos tumores ovarianos frente às células NK, onde há a

1 ligação desse marcador com as células NK, principalmente células do subconjunto
2 CD16⁺/CD56^{dim}, inibindo a sua função citolítica contra as células tumorais. A MUC-16 atua
3 ainda como uma molécula anti adesiva, impedindo a sinapse das células do câncer do ovário
4 com as células NK (BELISLE *et al.*, 2010).

5 **1.9.5 Linfócitos B (CD20)**

6 Os linfócitos B são as células efetoras da imunidade humoral e podem diferenciar-se
7 em células secretoras de anticorpos plasmáticos após estimulação (BOUAZIZ *et al.*, 2007).

8 Além disso, as células B contribuem para a imunidade celular, servindo como células
9 apresentadoras de antígeno e/ou pelo fornecimento de sinais co-estimuladores para a
10 maturação das células T (LUNDGREN *et al.*, 2016). O papel dos linfócitos B na imunidade
11 tumoral ainda é controverso. Segundo Coughlin *et al.* (2004), os linfócitos B apresentadores
12 de antígeno foram encontrados induzindo a ativação de células T citotóxicas específicas em
13 tumores, no entanto, como descrito por deVisser *et al.* (2005), anticorpos produzidos por
14 linfócitos B podem potencializar a inflamação, levando a um estado cronicado, o que
15 consequentemente leva ao risco aumentado da chance de desenvolvimento de tumores.

16 Além dessas proposições outra hipótese tem sido descrita na literatura onde as ações
17 favoráveis dos linfócitos B frente aos tumores poderiam ser mediadas por anticorpos
18 segregados por essas células, que poderiam promover a opsonização de antígenos tumorais,
19 levando a destruição de células tumorais, ou pela eliminação das células tumorais através da
20 ação de anticorpos citotóxicos celulares mediados pela ativação das vias do complemento.
21 Segundo os pesquisadores, foi possível verificar que os tumores ovarianos apresentaram
22 baixos números de células dendríticas, talvez as células B CD20⁺ serviriam como alternativa

1 como células apresentadoras de antígeno no microambiente tumoral. Esta última ideia se
2 ajusta bem com a co-localização observada de células B que se infiltram no tumor e células T
3 CD8+ no câncer epitelial de ovário (MILNE *et al.*, 2009).

4 A presença de linfócitos B CD20+ foram relacionados com o aumento da sobrevida
5 no câncer epitelial de ovário. Além disso, segundo os pesquisadores a combinação de células
6 CD8+ e CD20+ infiltradas no epitélio de tumores epiteliais de ovário foi associado com um
7 aumento significativo da sobrevida quando comparados aos tumores que continham CD8+,
8 mas não continham imunomarcagem para CD20+, ainda segundo os autores a presença de
9 linfócitos CD20+ no tecido tumoral estava associado a uma melhor resposta ao tratamento
10 naquelas pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau, quando estes linfócitos
11 combinavam com células T CD8+ (MILNE *et al.*, 2009).

12 Mahmoud *et al.* (2012) avaliaram a expressão de linfócitos B CD20+ em carcinomas
13 mamários e verificaram que a presença da maior contagem dessas células no infiltrado celular
14 linfocitário, das 1470 pacientes por eles avaliados, estava diretamente relacionado à melhora
15 no prognóstico bem como na sobrevida das pacientes, independentemente do tamanho das
16 massas tumorais, da presença ou não de células T CD8+, do grau tumoral e do potencial
17 invasor das células tumorais, dados que fornecem provas que sugerem que as células B, talvez
18 como parte da resposta imune humoral adaptativa, podem ter um papel fundamental na
19 resposta imunológica no câncer de mama.

20 Recentemente outros pesquisadores avaliaram a expressão dos genes dos linfócitos B
21 em câncer de mama e de ovário imunorreativo e verificaram que houve presença elevada dos
22 genes dessas células nos tumores avaliados, sendo a presença desses genes relacionada
23 diretamente com sobrevida global e livre de progressão da doença (IGLESIA *et al.*, 2014).

24 A expressão dos genes de células B foi altamente correlacionada com a expressão de
25 genes de células T, demonstrando que no câncer de mama e câncer de ovário, subtipos

1 específicos de linfócitos B tumor infiltrantes são clonalmente expandidos, enriquecendo a
2 resposta imune, o que fornece evidências de que os linfócitos B não são meramente um
3 marcador substituto para uma resposta de células T anti-tumoral, mas sim possíveis ativadores
4 de linfócitos T (IGLESIA *et al.*, 2014).

5 1.10 USO DO GRUPAMENTO DE DIFERENCIAÇÃO (CD) PARA DETECÇÃO DE 6 LINFÓCITOS

7 Grupamento de diferenciação ou do inglês *Cluster of Differentiation* (geralmente
8 abreviado como CD) é o conjunto de moléculas marcadoras da superfície celular usadas para
9 diferenciar variados tipos de células. Moléculas CD podem agir de diferentes modos,
10 geralmente como receptores ou como ligantes (a molécula que ativa um receptor). Uma
11 cascata de sinalização normalmente é iniciada, alterando o comportamento da célula.
12 Algumas proteínas CD não têm papel na sinalização, desempenhando outras funções como
13 adesão celular (ZOLA *et al.*, 2005).

14 Avanços da última década nos estudos da expressão de antígenos têm facilitado o
15 desenvolvimento de formas de diagnóstico. As moléculas CD constituem um conjunto de
16 antígenos candidatos promissores, pois foram relacionados ao estado de algumas doenças
17 infecciosas e neoplásicas (ELLMARK *et al.*, 2008). Níveis de expressão de antígenos CD
18 parecem refletir tanto a biologia do carcinoma quanto a distinção das linhas de alguns tipos
19 celulares cancerígenos (LIU, 2000; LIU & TRUE, 2002). Desta forma, essas moléculas podem
20 ser usadas para estudar a função das células e entender a diferenciação celular (BELOV *et al.*,
21 2001, LIU & TRUE, 2002).

2. Justificativa e Hipóteses

1 2.1 JUSTIFICATIVA

2 A literatura não possui muitos artigos definindo os fatores adicionais em relação ao
3 prognóstico das neoplasias malignas de ovário. Portanto, o estudo de novos marcadores
4 diagnósticos e prognósticos no câncer primário de ovário é importante para uma melhor
5 programação do tratamento cirúrgico e adjuvante das pacientes, onde a compreensão da
6 interação do sistema imunológico com os tecidos tumorais podem ser promissores para novas
7 terapias imunogênicas direcionadas, visto que o tratamento dessa neoplasia ainda é um
8 desafio na Oncologia Ginecológica

9 2.2 HIPÓTESES

10 Neoplasias malignas epiteliais primárias de ovário apresentam uma maior imuno-
11 marcação tecidual de CD3, CD4, CD8 e CD20 quando comparada com neoplasias benignas
12 epiteliais de ovário.

13 A imuno-marcação tem relação com fatores prognósticos clínicos, laboratoriais e
14 patológicos em neoplasias malignas.

3. Objetivos

- 1 1. Avaliar a expressão de CD3, CD4, CD8 e CD20 no estroma das neoplasias
2 benignas e malignas epiteliais primárias de ovário.
- 3 2. Relacionar a expressão de CD3, CD4, CD8 e CD20 no compartimento estromal
4 das neoplasias malignas epiteliais de ovário com fatores prognósticos (níveis séricos de
5 marcadores tumorais, tipo histológico, comprometimento linfonodal, resposta à
6 quimioterapia, sobrevida livre de doença, estadiamento e grau de diferenciação tumoral) em
7 neoplasias malignas primárias de ovário.

4. **M**ateriais e

Métodos

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

3 4.1 PACIENTES

4 Foram analisadas 328 prontuários das pacientes atendidas, no período de 1997 a 2017,
5 no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de
6 Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM,
7 Uberaba - MG. Destas 328 pacientes, foram selecionadas 77, as quais estavam enquadradas
8 dentro dos critérios de inclusão do trabalho. Essas 77 pacientes representam o “n” desse estudo.

9 **4.1.1 Critério de indicação de laparotomia exploradora**

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

1 **4.1.2 Caracterização dos grupos**

2 As pacientes foram divididas em dois grupos, de acordo com a confirmação do
3 diagnóstico anatomopatológico, desta forma se caracterizam: o primeiro grupo de neoplasias
4 ovarianas epiteliais benignas (n=40), e o segundo grupo de neoplasias ovarianas epiteliais
5 malignas primárias (n=37). Os casos *borderline* foram incluídos no grupo de neoplasias
6 malignas. O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da
7 Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, (Plataforma Brasil) - sob protocolo
8 número: CAAE: 34770014400005154 (**Anexo A**). O consentimento livre e esclarecido por
9 escrito foi obtido de cada paciente ou de seus familiares (**Anexo B**).

10 **4.1.3 Critérios de inclusão**

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

13 **4.1.4 Critérios de exclusão**

14 Os critérios de exclusão foram: neoplasia maligna secundária de ovário (metástase);
15 tumor primário de ovário de linhagem não epitelial; torção do pedículo anexial; tratamento
16 prévio à cirurgia (Quimioterapia); recidiva da neoplasia; perda de seguimento ou dados
17 incompletos no prontuário.

1 4.2 ELABORAÇÃO DO BANCO DE DADOS

2 Para elaboração do banco de dados específico para este estudo foram colhidas
3 informações constantes nos prontuários das 77 pacientes que se enquadraram no estudo.

4 **4.2.1 Perfil das pacientes**

5 Para caracterizar o perfil das pacientes os seguintes dados de prontuários foram
6 anotados: idade, gestação, paridade, idade da menarca, idade da menopausa, estado civil,
7 método contraceptivo, status hormonal, terapia hormonal e tabagismo.

8 **4.2.2 Exame ultrassonográfico**

9 Dados da ultrassonografia como: diâmetro, volume das massas, características de
10 ecografia e *color doppler* foram avaliados e anotados.

11 **4.2.3 Exames laboratoriais**

12 Dentre os exames laboratoriais pré-operatórios, foram colhidas informações do
13 hemograma como: hemoglobina, valor absoluto de neutrófilos, linfócitos e plaquetas, além de
14 glicemia e marcadores tumorais (CA125, CA15.3, CA19.9, CEA e AFP).

1 **4.2.4 Diagnóstico Anátomo patológico**

2 Foram anotados dados do tipo histológico, grau histológico, estadiamento (FIGO),
3 modelo da carcinogênese em tipo I e tipo II (subtipo molecular) no caso de tumores ovarianos
4 epiteliais e metástases em linfonodos.

5 **4.2.5 Relações neutrófilo/linfócito (RNL) e plaqueta/linfócito (RPL)**

6 Os valores de RNL e RPL foram obtidos através da divisão do número absoluto de
7 neutrófilos e plaquetas pelo número absoluto de linfócitos, respectivamente. Utilizou-se como
8 valor de corte 2,6 para RNL (ASHRAFGANJOEI *et al.*, 2016) e 200 para RPL (ASHER *et*
9 *al.*, 2011).

10 **4.2.6 Resposta à quimioterapia**

11 Foram anotados dados relativos à resposta ao tratamento quimioterápico (completa
12 ou parcial) das pacientes com neoplasia maligna epitelial primária de ovário.

1 **4.2.7 Dados de sobrevida**

2 Para a avaliação da sobrevida livre de doença (SLD), que é definida como tempo em
3 meses do diagnóstico até o momento da recidiva da doença, e sobrevida global (SG), que é
4 definida como tempo em meses do diagnóstico até a morte por qualquer causa, foram
5 anotados dados como: data da cirurgia, data da primeira recidiva, data da última consulta e
6 data do óbito, quando este se aplicava. Os grupos foram divididos em $SLD \geq 36$ meses e SLD
7 < 36 meses. A sobrevida global

8 **4.3 MÉTODOS**

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

12 **4.3.1 Análise anátomo-patológica**

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

1 A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de
2 acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* - FIGO
3 (ZEPERNICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

4 Na avaliação do grau histológico, os tumores de células da granulosa e os tumores
5 borderline foram considerados juntamente com o grupo de tumores bem diferenciados (grau
6 1). Para os demais tumores, foi realizada uma revisão do grau histológico pelo patologista,
7 sendo divididos em grau 1 (bem diferenciados), grau 2 (moderadamente diferenciados) e grau
8 3 (pouco diferenciados).

9 Os tumores ovarianos epiteliais foram divididos e classificados conforme o novo
10 modelo de carcinogênese (subtipo molecular), sendo agrupados em tipo I e tipo II. Os do tipo
11 I foram considerados os tumores borderline serosos, carcinomas serosos de baixo grau, e
12 carcinomas mucinosos, endometrioides e de células claras. Os do tipo II, os carcinomas
13 serosos de alto grau, tumores mesodérmicos malignos mistos (carcinosarcomas) e
14 indiferenciados (KURMAN & SHIH, 2010; KURMAN & SHIH, 2011; READE *et al.*, 2014).

15 **4.3.2 Análise imuno-histoquímica**

16 Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica foram processados em parafina e
17 revisados por patologista experiente. Os casos selecionados foram submetidos a novos cortes
18 (4µm) em lâminas silanizadas (ATPS - Silano, Sigma[®] A3648), empregando-se o Sistema de
19 detecção de Polímeros Novolink[™]. As lâminas permaneceram em estufa a uma temperatura
20 de 56°C por um período de 24h, e em seguida foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol,
21 permanecendo 5 minutos em cada banho e desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1
22 banho de álcool a 80%, 10 segundos cada banho

1 Posteriormente, após as lâminas permaneceram em banho de solução salina
2 tamponada, o PBS (pH 7.2) durante 5 minutos, para hidratação. Logo depois foi realizada a
3 recuperação dos antígenos. As lâminas foram colocadas em tubos de citologia contendo
4 solução tampão Citrato 10mM (pH 6,0) ou Tris-EDTA, conforme orientação do fabricante, e
5 colocados dentro de uma panela Pascal, que foi completada com água destilada até o limite
6 indicado durante 30 minutos a uma temperatura de 100°C. Então, os tubos foram retirados de
7 dentro da panela e colocados sobre a bancada para seu resfriamento à temperatura ambiente
8 de 22°C.

9 As lâminas foram colocadas em um rack e lavadas com água destilada e enxugadas,
10 cuidadosamente, na adjacência do corte, não permitindo que os cortes ficassem secos. Após
11 este processo, as lâminas foram colocadas em uma prancha de incubação e para neutralizar a
12 peroxidase endógena foi utilizado o Bloqueador de Peroxidase (água oxigenada à 3%) sobre
13 cada corte durante 15 minutos.

14 Após esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão PBS durante 5 minutos
15 cada lavagem. Em seguida as lâminas foram incubadas com Bloqueador de Proteínas por 15
16 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão PBS durante 5
17 minutos cada lavagem e incubadas com anticorpo primário diluído em BSA, (o anticorpo foi
18 diluído em albumina do soro bovina (Sigma[®]) de acordo com as indicações presentes em suas
19 especificações. Essas preparações de albumina bovina (BSA a 2%) e anticorpo primário
20 permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir coloração de fundo), por cerca de 18
21 horas, em câmara úmida, a 4 °C.

22 Foram utilizados controles positivos para cada anticorpo, mediante pré-requisitos do
23 fabricante. Após a incubação *overnight* a 4 °C com os anticorpos específicos anti-CD3, anti-
24 CD4, anti-CD8 e anti-CD20, as lâminas foram colocadas à temperatura ambiente por cerca de

1 15 minutos e foram novamente lavadas com tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem e
2 secas.

3 Os anticorpos primários utilizados no trabalho, diluições e controles estão descritos
4 no **Anexo C**.

5 As lâminas então, foram incubadas com Anticorpo pós-primário durante 30 minutos.
6 Foram lavadas com tampão PBS durante 5 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas
7 com Polímero Novolink™ durante 30 minutos. Foram lavadas com tampão PBS durante 5
8 minutos cada lavagem.

9 Após lavagem com PBS, as lâminas foram reveladas através da adição da solução
10 cromógena (Diaminobenzidine - DAB), por 5 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em
11 água corrente e contra-coradas em hematoxilina de Harris.

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

16 As soluções e tampões utilizados constam no **Anexo D**.

17 **4.3.3 Leitura das lâminas de imuno-histoquímica**

18 As lâminas submetidas à reação imuno-histoquímica foram analisadas para a análise
19 da porcentagem de células marcadas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-
20 CD20. A porcentagem de imunomarcção no estroma foi avaliada subjetivamente utilizando-
21 se a graduação de 0 a 3: 0 (até 25% do corte), 1 (de 26 até 50% do corte), 2 (de 51 até 75% do

1 corte), 3 (acima de 76% do corte) (XU *et al.*, 2018), e foi realizada em 10 campos aleatórios
2 do estroma adjacente ao epitélio do corte, capturados com aumento de 400X.

3 Foram utilizados controles positivo e negativo para cada anticorpo. Dois
4 observadores avaliaram as lâminas.

5 As duas leituras acontecem para aumentar a confiança dos resultados, sendo que após
6 foi realizado o teste de *Kappa* para verificar concordância entre os observadores. Os casos
7 discordantes foram revistos em conjunto e os resultados obtidos por consenso.

8 **4.3.4 Análise estatística**

9 Os dados foram analisados pelo *GraphPad Instat software*[®]. De acordo com a
10 distribuição (teste de Kolmogorov-Smirnov), os resultados não paramétricos foram expressos
11 em medianas (mínimo-máximo) e percentis. Foi utilizado o teste exato de Fisher, com nível
12 de significância menor que 0,05. No estudo imunohistoquímico, a concordância entre dois
13 observadores foi realizada através do *kappa*: $\kappa < 0,4$: concordância fraca; $0,4 \leq \kappa < 0,8$:
14 concordância moderada; $0,8 \leq \kappa < 1,0$: concordância forte; $\kappa = 1,0$: concordância perfeita
15 (ARANGO, 2001).

16 **4.3.5 Estruturação do banco de dados**

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

1 **4.3.6 Redação do texto**

2 O texto deste trabalho foi redigido conforme as normatizações técnicas científicas da
3 Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), utilizando como suporte referencial,
4 material do banco de dados literário da *National Library of Medicine, National Institutes of*
5 *Health United States of America - PubMed.*

5. Resultados

1 Foram inseridas neste trabalho 77 pacientes distribuídas em 2 grupos (40 neoplasias
2 benignas e 37 neoplasias malignas). No grupo de neoplasias malignas, a mediana de idade foi
3 de 50 anos (25-73 anos), a paridade mediana foi de 2 partos (0-7 partos), a idade mediana de
4 menarca foi 13 anos (9-16 anos), a idade mediana da menopausa foi 50 anos (38-57 anos). Em
5 relação ao uso de método contraceptivo, 2 (5,4%) utilizavam contraceptivo hormonal,
6 nenhuma utilizava preservativo, e 4 (10,8%) foram submetidas à laqueadura tubária. Uma
7 paciente (2,7%) utilizava terapia de reposição hormonal e 6 pacientes (16,2%) eram
8 tabagistas. Em relação ao status hormonal, 22 (59,5%) estavam no menacme e 15 (40,5%)
9 estavam na menopausa. 13 pacientes (35,1%) deste grupo foram a óbito (tabelas 3 e 4).

10 No grupo de neoplasias benignas, a mediana de idade foi de 48 anos (18-69 anos), a
11 paridade mediana foi de 2 partos (0-9 partos), a idade mediana de menarca foi 13 anos (10-17
12 anos), a idade mediana da menopausa foi 49 anos (29-55 anos). Em relação ao uso de método
13 contraceptivo, 7 (17,5%) utilizavam contraceptivo hormonal, 1 (2,5%) utilizava preservativo,
14 e 16 (40,0%) foram submetidas à laqueadura tubária. 3 pacientes (7,5%) utilizava terapia de
15 reposição hormonal e 10 pacientes (25,0%) eram tabagistas. Em relação ao status hormonal,
16 23 (57,5%) estavam no menacme e 17 (42,5%) estavam na menopausa (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Variáveis quantitativas das pacientes com Neoplasia Maligna/Benigna de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017.

(n=37 malignas / 40 benignas)	Mediana		Mínimo		Máximo	
	Malignas	Benignas	Malignas	Benignas	Malignas	Benignas
Idade (anos)	50,0	48,0	25,0	18,0	73,0	69,0
Gestação	2,0	3,0	0,0	0,0	8,0	10,0
Paridade	2,0	2,0	0,0	0,0	7,0	9,0
Idade Menarca (anos)	13,0	13,0	9,0	10,0	16,0	17,0
Idade Menopausa (anos)	50,0	49,0	38,0	29,0	57,0	55,0
Níveis de CA125 (U/mL)	77,8	16,8	7,3	0,6	1529,0	161,4
Níveis de CA15,3 (U/mL)	21,2	14,7	6,9	5,2	813,0	35,6
Níveis de CA19,9 (U/mL)	12,7	8,6	0,8	0,6	444,2	83,5
Níveis de CEA (U/mL)	1,6	1,5	0,2	0,2	48,7	6,4
Níveis de AFP	1,9	1,8	0,5	0,5	1000,0	27,8
Volume da massa ao ultrasson (mL)	611,8	299,0	22,0	6,1	4000,0	8260,0
Maior diâmetro da massa ao ultrasson (cm)	12,5	8,8	3,8	2,3	22,9	34,1
Sobrevida livre de doença (meses)	17,0	--	0,0	--	193,0	--
Sobrevida Global (meses)	21,0	--	0,0	--	193,0	--

Fonte: O Autor.

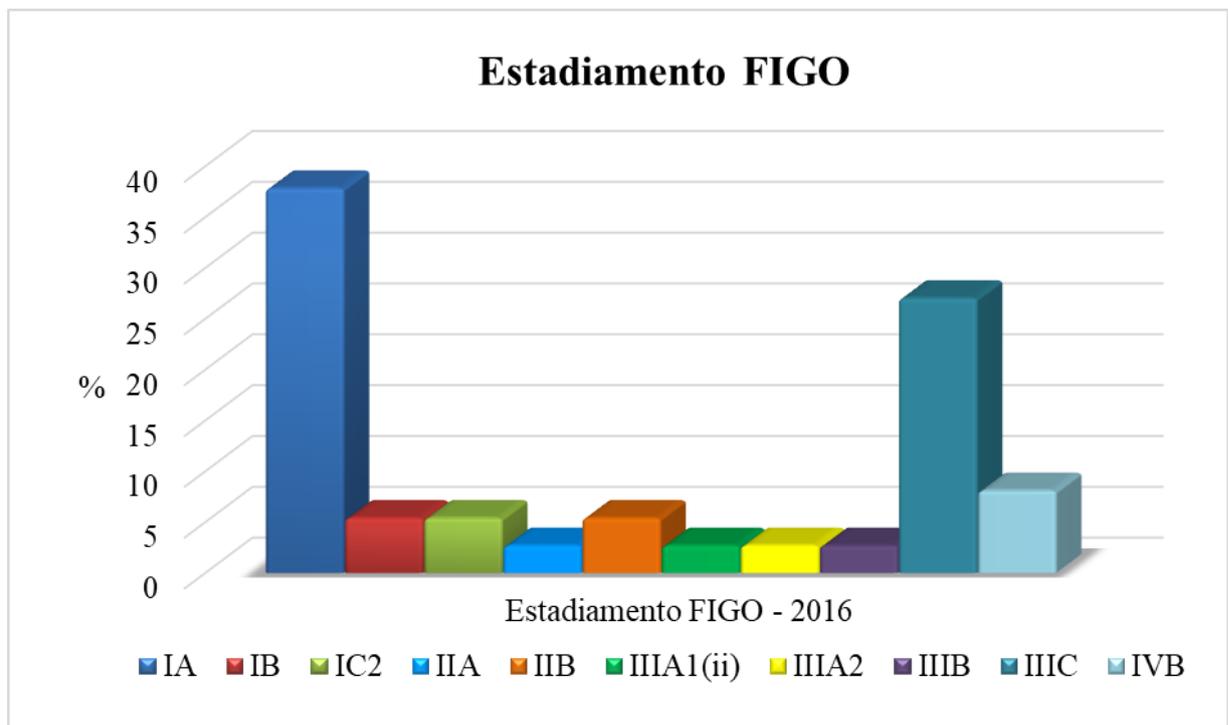
Tabela 4 - Variáveis qualitativas das pacientes com Neoplasia Maligna/Benigna de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017.

	Grupo Neoplasia Maligna (n=37)		Grupo Neoplasia Benigna (n=40)	
	n	%	n	%
<i>Estado civil</i>				
Amasiadas	0	0,0	5	12,5
Casadas	22	59,5	19	47,5
Divorciadas	3	8,1	2	5,0
Solteiras	8	21,6	10	25,0
Viúvas	4	10,8	4	10,0
<i>Método Contraceptivo</i>				
Hormonal	2	5,4	7	17,5
Barreira	0	0,0	1	2,5
Laqueadura Tubária	4	10,8	16	40,0
Nenhum	31	83,8	16	40,0
<i>Status Hormonal</i>				
Menacme	22	59,5	23	57,5
Menopausa	15	40,5	17	42,5
<i>Terapia Hormonal</i>				
Sim	1	2,7	3	7,5
Não	36	97,3	37	92,5
<i>Tabagismo</i>				
Sim	6	16,2	10	25,0
Não	30	81,1	27	67,5
Ex-tabagista	1	2,7	3	7,5
<i>Óbito</i>				
Sim	13	35,1	0	0,0
Não	24	64,9	40	100,0

Fonte: O Autor.

1 O estadiamento das neoplasias malignas segundo a FIGO foram: 14 (37,83%)
 2 pacientes IA, 2 (5,41%) IB, 2 (5,41%) IC2, 1 (2,70%) IIA, 2 (5,41%) IIB, 1 (2,70%) IIIA1(ii),
 3 1 (2,70%) IIIA2, 1 (2,70%) IIIB, 10 (27,03%) IIIC e 3 (8,11%) IVB das pacientes (figura 2
 4 em anexo).

5 **Figura 2:** Frequência do estadiamento das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário
 6 atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
 7 Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017, segundo os
 8 critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.

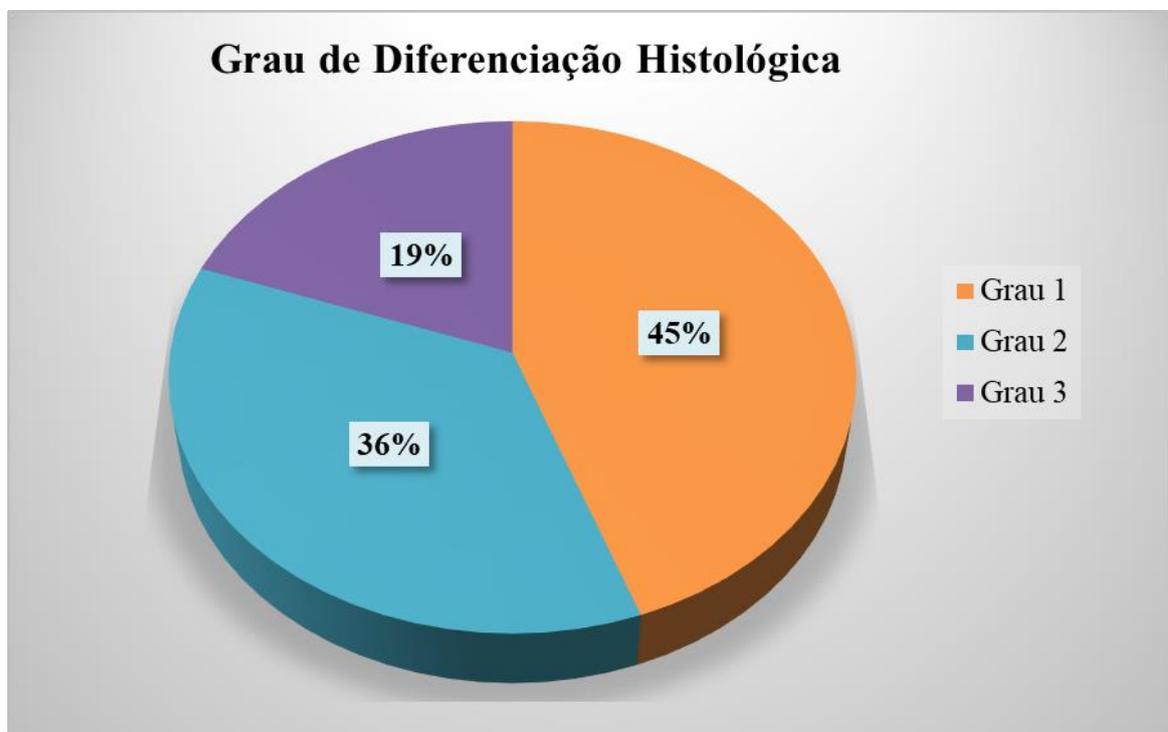


9

Fonte: O Autor.

1 Em relação ao grau de diferenciação histológica, grau 1 16 (43,2%) dos tumores
2 malignos foram classificados, grau 2 14 (37,8%) e grau 3 7 (18,9%).

3 **Figura 3:** Frequência do Grau Histológico das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário
4 atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
5 Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017, segundo os
6 critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.

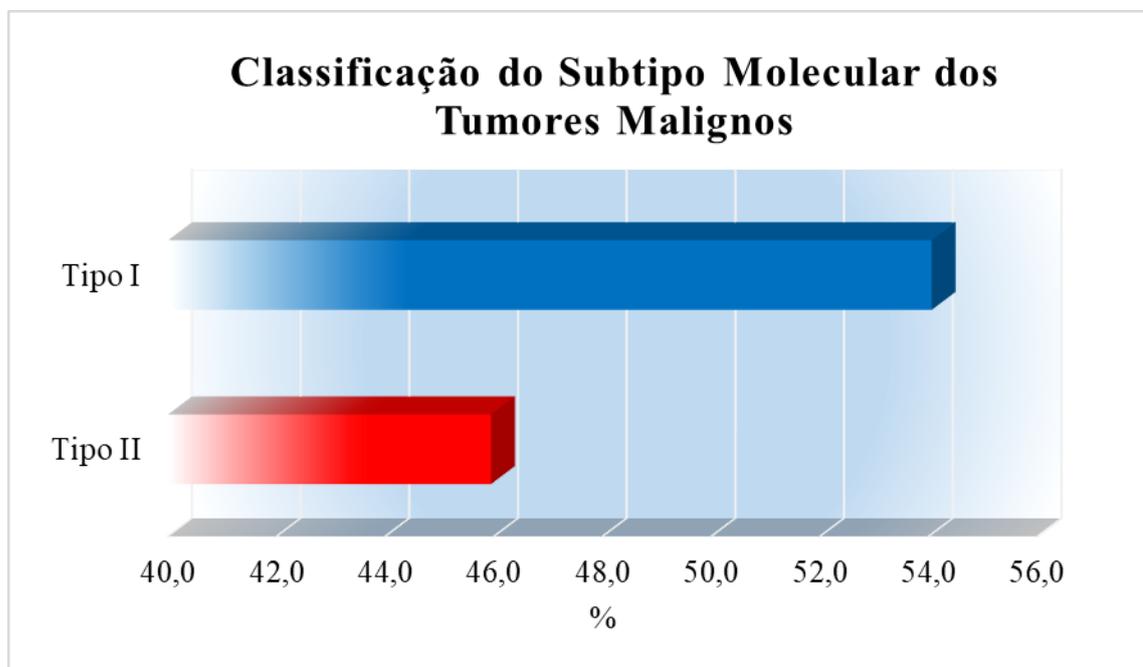


7

Fonte: O Autor.

1 Os subtipos moleculares das neoplasias malignas foram: tipo I 20 (54,05%) e tipo II
2 17 (45,95%).

3 **Figura 4:** Frequência do Subtipo Molecular das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário
4 atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
5 Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017, segundo os
6 critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.



7

Fonte: O Autor.

- 1 A Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Benignas, estão listadas
2 na tabela 5.

Tabela 5 - Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Benignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017.

	Grupo Neoplasias Benignas (n=40)	
	n	%
Cistoadenoma Seroso	21	52,5
Cistoadenoma Mucinoso	16	40
Cistadenoma Seromucinoso e Tumor de Brenner	1	2,5
Cistoadenoma Mucinoso e Tumor de Brenner	1	2,5
Cistoadenoma Seroso e Tumor de Brenner	1	2,5

Fonte: O autor.

- 3 A Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas, estão listadas
4 na tabela 6.

Tabela 6 - Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017.

	Grupo Neoplasias Malignas (n=37)	
	n	%
Cistoadenocarcinoma Papilífero Seroso	13	35,2
Cistoadenocarcinoma Mucinoso <i>Borderline</i>	12	32,4
Cistoadenoma Seroso <i>Bordeline</i>	3	8,1
Adenocarcinoma Anaplásico Papilífero	3	8,1
Cistoadenocarcinoma Mucinoso	2	5,4
Adenocarcinoma Endometriode	1	2,7
Carcinoma de Células Claras	1	2,7
Cistoadenocarcinoma	1	2,7
Tumor Endometriode Proliferativo Atípico <i>Bordeline</i>	1	2,7

Fonte: O autor.

1 A Tabela 7 mostra as diferenças na marcação tecidual estromal por imuno-
2 histoquímica das citocinas entre neoplasias malignas e benignas de ovário.

3 Houve maior imuno-marcação de CD3 em neoplasias malignas comparando-se às
4 neoplasias benignas.

5 Houve maior imuno-marcação de CD4 em neoplasias benignas quando comparando-
6 se às neoplasias malignas.

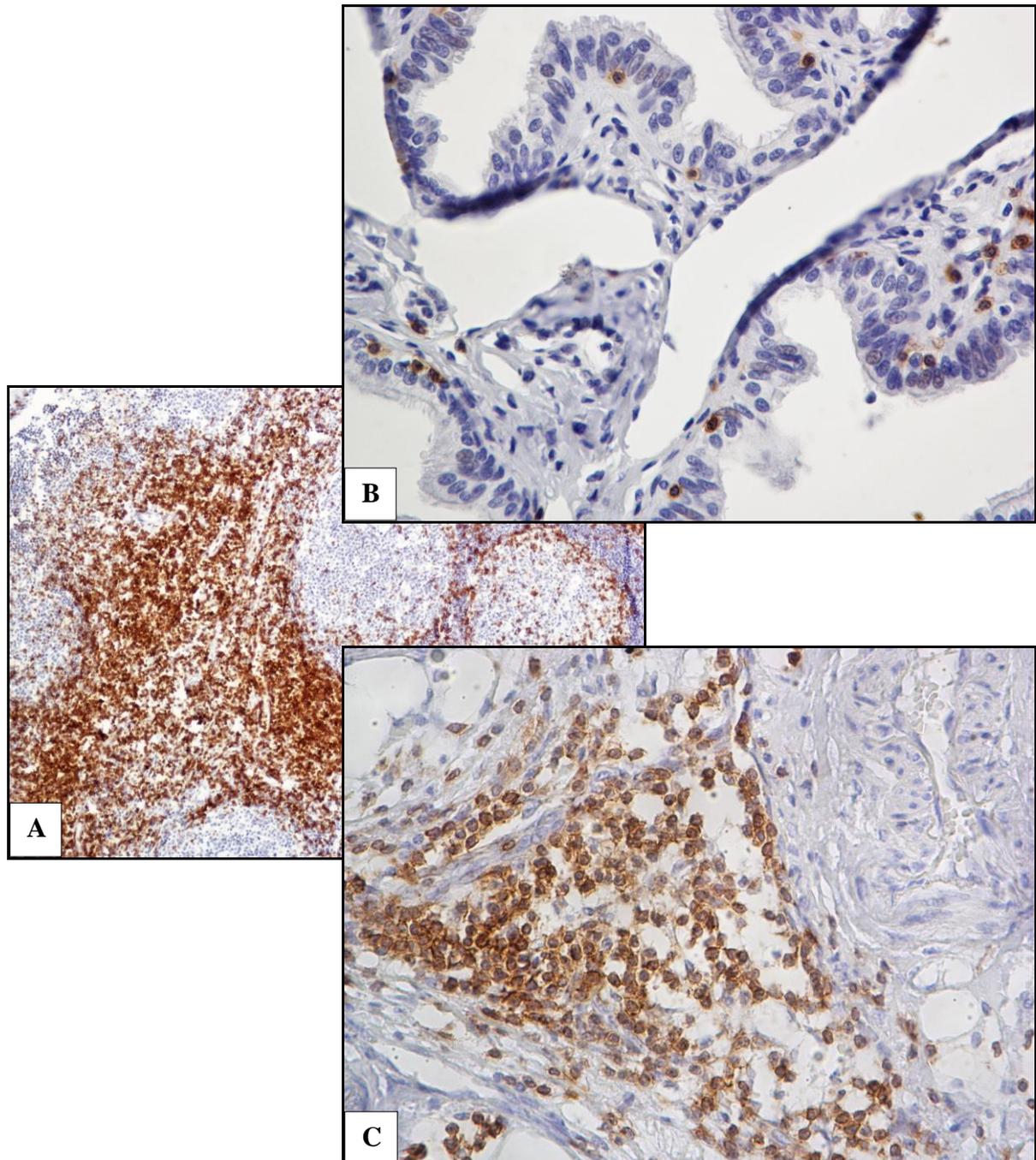
Tabela 7 - Diferenças na marcação tecidual estromal por imuno-histoquímica das citocinas entre neoplasias malignas e benignas de ovário das atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2017.

		0/1	2/3	<i>p</i>
CD3 Estromal	Neoplasias Benignas (n=40)	36/40 (90,0%)	4/40 (10,0%)	0,0001*
	Neoplasias Malignas (n=37)	18/37 (48,6%)	19/37 (51,4%)	
CD4 Estromal	Neoplasias Benignas (n=40)	15/40 (37,5%)	25/40 (62,5%)	0,0408*
	Neoplasias Malignas (n=37)	23/37 (62,2%)	14/37 (37,8)	
CD8 Estromal	Neoplasias Benignas (n=40)	21/40 (52,5%)	19/40 (47,5%)	0,3627
	Neoplasias Malignas (n=37)	15/37 (40,5%)	22/37 (59,5%)	
CD20 Estromal	Neoplasias Benignas (n=40)	40/40 (100%)	0/40 (0,0%)	0,4805
	Neoplasias Malignas (n=37)	36/37 (97,3%)	1/37 (2,7%)	

* Teste Exato de Fisher, com nível de significância de $p < 0,005$.

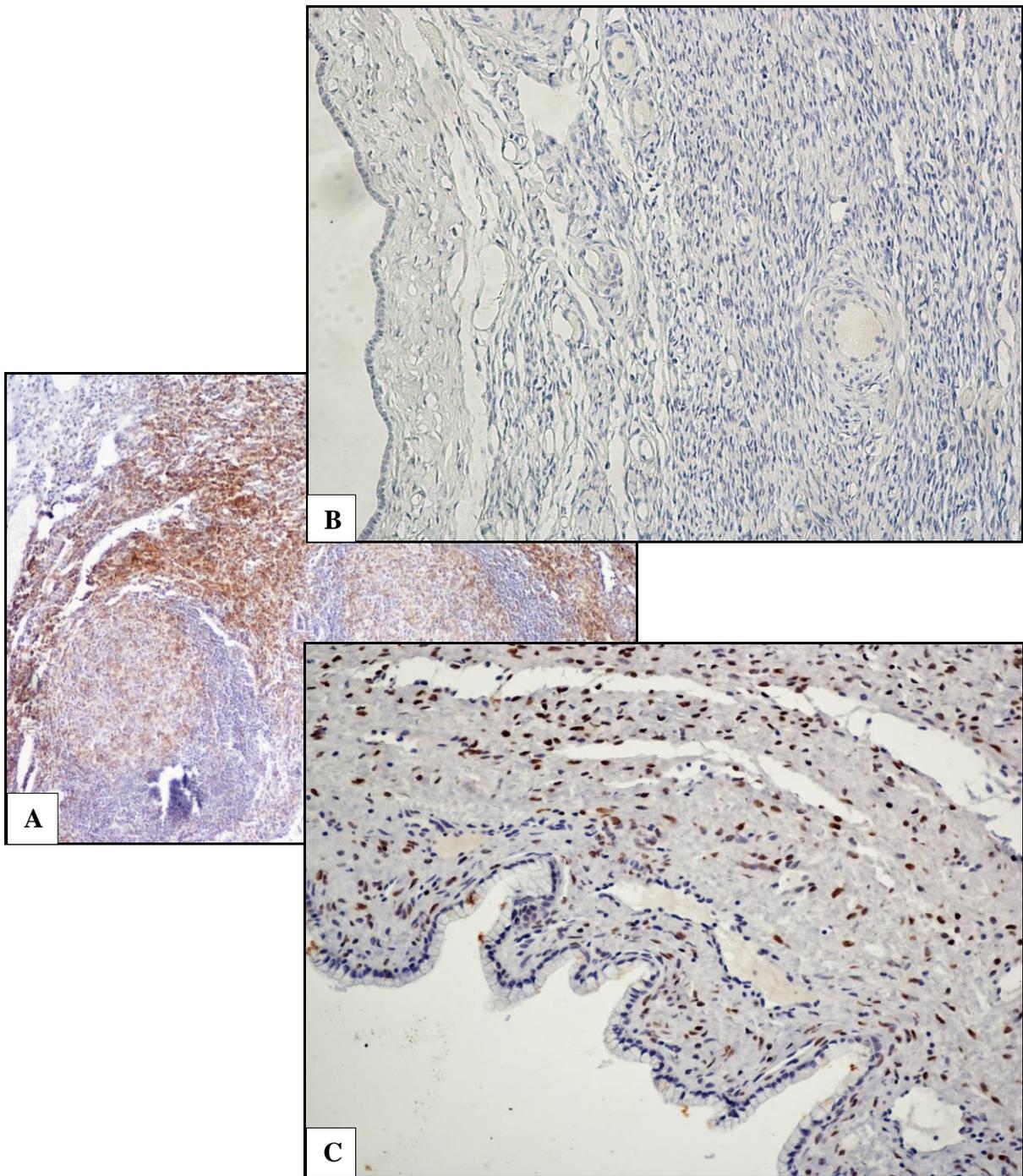
Fonte: O Autor.

1 **Figura 5:** Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD3



- 2 **Figura 5** - Marcações imuno-histoquímicas. Controle/Cortes histológicos de neoplasia epitelial ovariana.
3 **A:** Marcação celular das células CD3 no tecido de controle positivo (amígdala) no aumento de 100x. **B:**
4 Marcação imuno-histoquímica estromal (0-1) das células CD3 em cistoadenoma seroso no aumento de
5 400x. **C:** Marcação imuno-histoquímica estromal (2-3) das células CD3 em adenocarcinoma
6 moderadamente diferenciado seroso no aumento de 400x. Fonte: O Autor.

1 **Figura 6:** Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD4



2 **Figura 6 -** Marcações imuno-histoquímicas. Controle/Cortes histológicos de neoplasia epitelial ovariana.

3 **A:** Marcação celular das células CD4 no tecido de controle positivo (amígdala) no aumento de 100x. **B:**

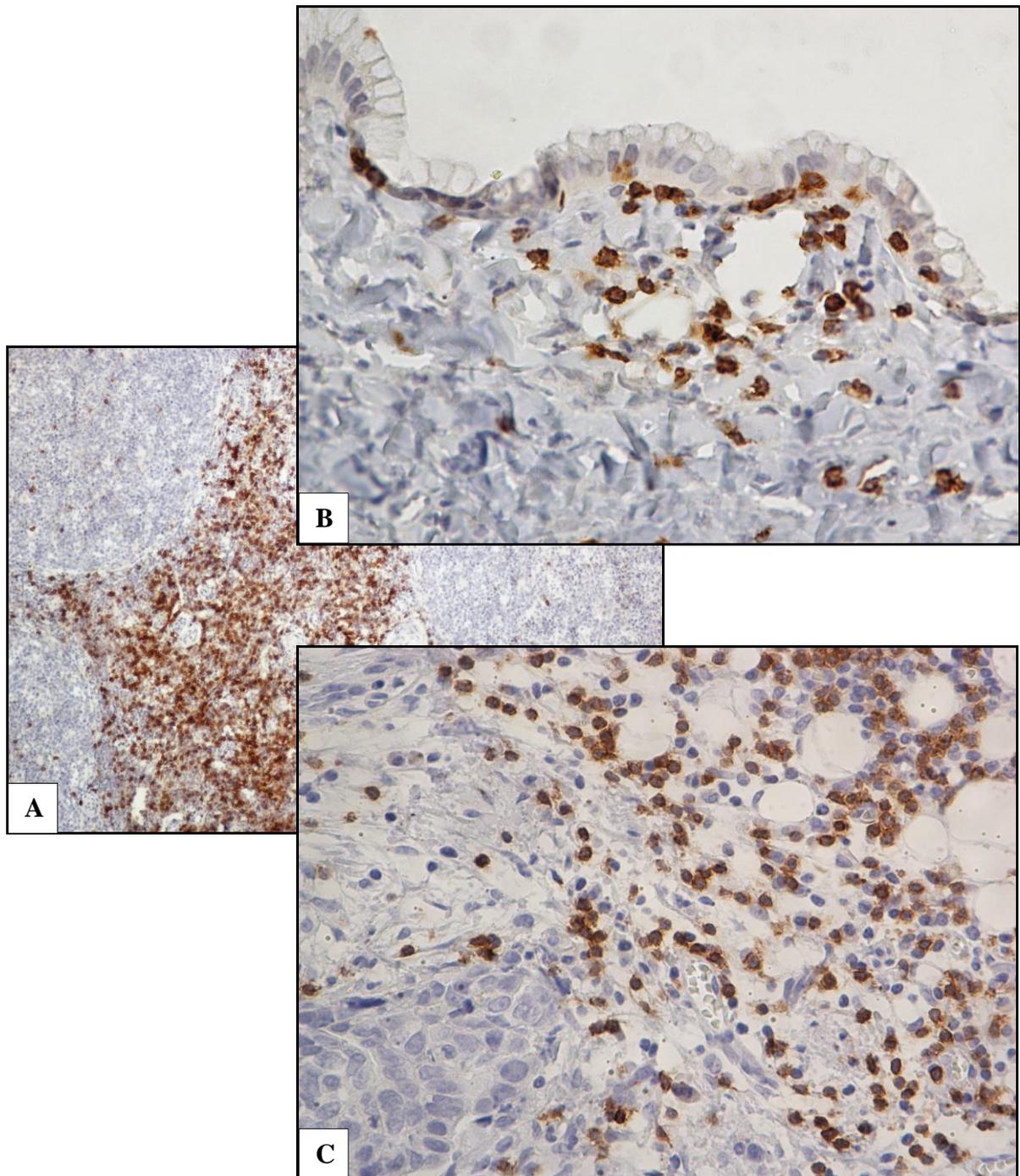
4 Marcação imuno-histoquímica estromal (0-1) das células CD4 em cistoadenoma seroso no aumento de

5 200x. **C:** Marcação imuno-histoquímica estromal (2-3) das células CD4 em cistadenoma seromucinoso e

6 tumor de Brenner no aumento de 200x.

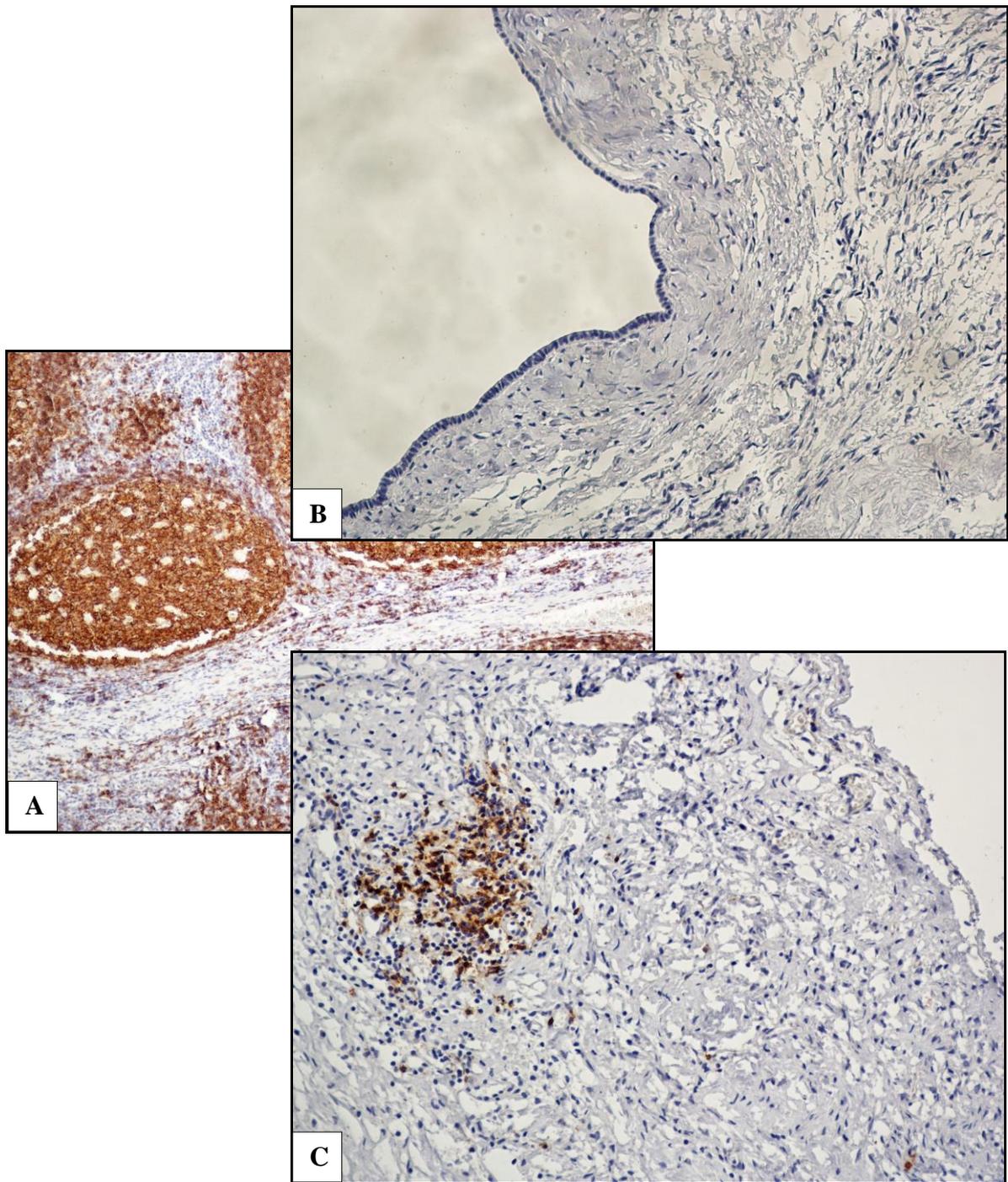
Fonte: O Autor.

1 **Figura 7:** Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD8



- 2 **Figura 7 -** Marcações imuno-histoquímicas. Controle/Cortes histológicos de neoplasia epitelial ovariana.
 3 **A:** Marcação celular das células CD8 no tecido de controle positivo (amígdala) no aumento de 100x. **B:**
 4 Marcação imuno-histoquímica estromal (0-1) das células CD8 em cistoadenoma mucinoso no aumento de
 5 400x. **C:** Marcação imuno-histoquímica estromal (2-3) das células CD8 em adenocarcinoma
 6 moderadamente diferenciado seroso no aumento de 400x. Fonte: O Autor.

1 **Figura 8:** Marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD20



- 2 **Figura 8 -** Marcações imuno-histoquímicas. Controle/Cortes histológicos de neoplasia epitelial ovariana.
3 **A:** Marcação celular das células CD20 no tecido de controle positivo (amígdala) no aumento de 100x. **B:**
4 Marcação imuno-histoquímica estromal (0-1) das células CD20 em cistoadenoma seroso no aumento de
5 200x. **C:** Marcação imuno-histoquímica estromal (2-3) das células CD20 em cistoadenoma seroso no
6 aumento de 200x.

Fonte: O Autor.

1 A tabela 8 mostra a relação entre os imuno-marcadores estudados e fatores
2 prognósticos. Nossa avaliação abrangeu apenas o estroma tumoral. Foi possível verificar que
3 o subtipo molecular II, dos tumores malignos, associou-se às imuno-marcações aumentadas
4 de CD8 $p=0,0227$. Na avaliação de metástases em linfonodos verificou-se que a ausência de
5 imuno-marcação de CD20 $p=0,0362$, associou-se à ausência de metástases linfonodais.

6 Não houve diferença significativa em relação aos demais imuno-marcadores
7 estudados com o restante dos fatores prognósticos e hematológicos avaliados.

Tabela 8: Distribuição das leituras dos imuno-marcadores com imuno-marcação estromal, e correlações com o grau histológico, estadiamento, subtipo molecular, metástases em linfonodos, fatores hematológicos (RNL/RPL), glicemia, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença das neoplasias malignas de ovário.

		CD3 0	CD3 1,2,3	CD4 0	CD4 1,2,3	CD8 0	CD8 1,2,3	CD20 0	CD20 1,2,3
Grau Histológico (n=37)	1	5/16 (31,3%)	11/16 (68,7%)	3/16 (18,8%)	13/16 (81,2%)	5/16 (31,3%)	11/16 (68,7%)	16/16 (100,0%)	0/16 (0,0%)
	2/3	6/21 (28,6%)	15/21 (71,4%)	7/21 (33,3%)	14/21 (66,7%)	4/21 (19,0%)	17/21 (81,0%)	18/21 (85,7%)	3/21 (14,3%)
Estadiamento (FIGO) (n=37)	I/II	7/21 (33,3%)	14/21 (66,7%)	4/21 (19,0%)	17/21 (81,0%)	6/21 (28,6%)	15/21 (71,4%)	20/21 (95,2%)	1/21 (4,8%)
	III/IV	4/16 (25,0%)	12/16 (75,0%)	6/16 (37,5%)	10/16 (62,5%)	3/16 (18,8%)	13/16 (81,2%)	14/16 (84,5%)	2/16 (12,5%)
Subtipo Molecular (n= 37)	I	6/20 (30,0%)	14/20 (70,0%)	5/20 (25,0%)	15/20 (75,0%)	8/20 (40,0%)	12/20 (60%)	20/20 (100,0%)	0/20 (0,0%)
	II	5/17 (29,4%)	12/17 (70,6%)	5/17 (29,4%)	12/17 (70,6%)	1/17 (5,9%)	16/17 (94,1%)*	14/17 (82,4%)	3/17 (17,6%)
Metástases em Linfonodos (n=24)	Positiva	1/5 (20,0%)	4/5 (80,0%)	2/5 (40,0%)	3/5 (60,0%)	1/5 (20,0%)	4/5 (80,0%)	3/5 (60,0%)	2/5 (40,0%)
	Negativa	6/19 (31,6%)	13/19 (68,4%)	2/19 (10,5%)	17/19 (89,5%)	4/19 (21,0%)	15/19 (79,0,0%)	19/19 (100,0%)**	0/19 (0,0%)
Hemoglobina \geq 12 (n=37)	\geq 12	7/24 (29,2%)	17/24 (70,8%)	7/24 (29,2%)	17/24 (70,8%)	6/24 (25,0%)	18/24 (75,0%)	22/24 (91,7%)	2/24 (8,3%)
	<12	4/13 (30,8%)	9/13 (69,2%)	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	12/13 (92,3%)	1/13 (7,7%)
Relação Neutrófilo/Linfócito (n=37)	\leq 2,6	7/25 (28,0%)	18/25 (72,0%)	6/25 (24,0%)	19/25 (76,0%)	5/25 (20,0%)	20/25 (80,0%)	23/25 (92,0%)	2/25 (8,0%)
	>2,6	4/12 (33,3%)	8/12 (66,7%)	4/12 (33,3%)	8/12 (66,7%)	4/12 (33,3%)	8/12 (66,7%)	11/12 (91,7%)	1/12 (8,3%)
Relação Plaqueta/Linfócito (n=37)	\leq 200	7/28 (25,0%)	21/28 (75,0%)	9/28 (32,1%)	19/28 (67,9%)	8/28 (28,6%)	20/28 (71,4%)	26/28 (92,9%)	2/28 (7,1%)
	>200	4/9 (44,4%)	5/9 (55,6%)	1/9 (11,1%)	8/9 (88,9%)	0/9 (0,0%)	9/9 (100,0%)	8/9 (88,9%)	1/9 (11,1%)
Glicemia (mg/dL) (n=37)	\leq 100	7/27 (25,9%)	20/27 (74,1%)	6/27 (22,2%)	21/27 (77,8%)	7/27 (25,9%)	20/27 (74,1%)	25/27 (92,6%)	2/27 (7,4%)
	>100	4/10 (40,0%)	6/10 (60,0%)	4/10 (40,0%)	6/10 (60,0%)	2/10 (20,0%)	8/10 (80,0%)	9/10 (90,0%)	1/10 (10,0%)
Resposta à Quimioterapia (n=18)	Completa	4/12 (33,3%)	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	10/12 (83,3%)	2/12 (16,7%)	10/12 (83,3%)	12/12 (100,0%)	0/12 (0,0%)
	Sem resposta	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)	2/6 (33,3%)	4/6 (66,7%)	1/6 (16,7%)	5/6 (83,3%)	5/6 (83,3%)	1/6 (16,7%)
Sobrevida Livre da Doença (n=37)	\geq 36 meses	2/14 (14,3%)	12/14 (85,7%)	3/14 (21,4%)	11/14 (78,6%)	5/14 (35,7%)	9/14 (64,3%)	14/14 (100,0%)	0/14 (0,0%)
	< 36 meses	9/23 (39,1%)	14/23 (60,9%)	7/23 (30,4%)	16/23 (69,6%)	4/23 (17,4%)	19/23 (82,6%)	20/23 (87,0%)	3/23 (13,0%)

* $p=0,0227$, comparando subtipos moleculares I/II; ** $p=0.0362$, comparando a metástase em linfonodos negativa/positiva. (Teste Exato de Fisher $p<0,005$).

6. Discussão

1 A origem do câncer ovariano ainda é incerta. As descobertas que auxiliam no
2 diagnóstico caminham lentamente no decorrer das últimas décadas e o conhecimento dos
3 mecanismos por quais as células epiteliais ovarianas sofrem transformações malignas ainda
4 é uma incógnita na comunidade científica.

5 Os fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de câncer de ovário são
6 idade, obesidade, história reprodutiva, uso de contraceptivos, história familiar, terapia de
7 reposição hormonal e tabagismo, contudo, as razões para o desenvolvimento da doença não
8 foram elucidadas (JAMMAL *et al.*, 2017).

9 Apesar disso, existem fatores que limitam ou reduzem o risco de desenvolver a
10 doença, que incluem hábitos de vida saudáveis como prática de exercícios físicos, a inibição
11 ou parada da ovulação normal, por gravidez ou contracepção, aumento no período de
12 lactação, multiparidade e cirurgia previa de salpingectomia ou salpingo-ooforectomia, sendo
13 esta última capaz de reduzir em 75-96% a chance de desenvolver câncer ovariano
14 (JAMMAL *et al.*, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

15 Os fatores de risco não foram abordados como determinantes para a incidência da
16 doença, mas nossos resultados demonstram que 40% das pacientes com neoplasias benignas
17 realizaram laqueadura tubaria em comparação com 10,8% das com neoplasia maligna. Em
18 relação ao método contraceptivo, 17,5% das pacientes com neoplasias benignas faziam uso
19 de contraceptivo hormonal em comparação com 5,4% das com neoplasia maligna.

20 Em nosso estudo foram inseridas 40 pacientes do grupo de neoplasias benignas e 37
21 de neoplasias malignas epiteliais primárias de ovário. A mediana de idade para o grupo
22 benigno foi de 48 anos e 50 anos para o grupo de malignas, dados coerentes com os
23 descritos na literatura (AMIRA *et al.*, 2019).

24 Alguns autores relatam que o câncer epitelial de ovário não é considerado um
25 tumor com boa resposta das células imunes às alterações teciduais que a doença ocasiona,

1 resultando no escape do microambiente tumoral a estas células que são fundamentais para a
2 não evolução do tumor (CUBILLOS-RUIZ *et al.*, 2010; LAVOUÉ *et al.*, 2013).

3 Estudando o estroma dos tumores é possível verificar a presença de células do
4 sistema imune atuando tanto no estroma quanto no epitélio das neoplasias. Dessa forma,
5 elucidar o papel que cada grupo celular pode nortear os possíveis tratamentos.

6 A presença de TILs é considerada um reflexo da resposta imune ao tumor
7 (LEFFERS *et al.*, 2009). Alguns exercem uma atividade citotóxica antitumoral direta. O
8 mecanismo pelo qual os TILs entram no tumor se dá após o recrutamento dos linfócitos T
9 para o local do tumor, onde atravessam a parede do vaso para adentrar na neoplasia,
10 migrando para dentro do estroma, um microambiente complexo composto de células não
11 cancerosas junto com a matriz extracelular. A partir dessa migração, exercem uma interação
12 com as células tumorais (BOUGHERARA *et al.*, 2015).

13 Muitos trabalhos abordam o significado prognóstico de TILs no câncer de ovário,
14 mas os resultados são ainda controversos (LI *et al.*, 2017). A localização, o subtipo e
15 densidade de TILs são os principais determinantes desse valor prognóstico (ZHANG *et al.*,
16 2003; SATO *et al.*, 2005; HAMANISHI *et al.*, 2007; LEFFERS *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2017).

17 A ativação do microambiente do estroma tem sido apontada como um fator
18 importante na progressão do câncer (BREMNES *et al.*, 2011). A importância de se estudar a
19 presença de TILs nesse compartimento se deve ao fato de que os diversos agrupamentos
20 celulares distintos situados no estroma, através de um rearranjo matricial criam
21 posteriormente um microambiente específico tumoral promotor da carcinogênese, resultando
22 em proliferação, invasão e sobrevivência das células cancerígenas. Esses eventos baseiam-se
23 em atividades orquestradas por uma interação célula a célula (KALLURI & ZEISBERG,
24 2006; BREMNES *et al.*, 2011; RYNER *et al.*, 2015).

1 Nosso estudo demonstrou maior presença das células CD3 estromal no grupo de
2 pacientes com neoplasias malignas primárias de ovário quando comparado com o grupo de
3 neoplasias benignas. Recentemente, alguns autores relataram que os linfócitos T CD3 foram
4 a principal população celular no tumor *in situ*, assim como na ascite e no sangue periférico
5 de pacientes com carcinoma ovariano (LUKESOVA *et al.*, 2015). Outro estudo também
6 demonstrou presença abundante de linfócitos T CD3, analisando amostras de tecido tumoral,
7 ascite e sangue periférico. Segundo os autores, a presença da maior concentração destas
8 células estava relacionada com pior prognóstico, visto que estava associado ao estágio IV
9 quando comparado ao estágio III da neoplasia maligna de ovário (RÅDESTAD *et al.*, 2018).

10 Por outro lado, não encontramos associação entre linfócitos T CD3 com fatores
11 prognósticos, talvez pelo tamanho da amostra e heterogeneidade dos tipos tumorais
12 estudados.

13 Zhang *et al.* (2003) evidenciaram que a presença de linfócitos T CD3+
14 apresentavam-se mais expressos em estadiamentos mais avançados da neoplasia maligna
15 serosa de ovário. A localização dos TILs parece ser de grande relevância para o seu impacto
16 prognóstico (ZHANG *et al.*, 2003, CLARKE *et al.*, 2009). Um estudo revela que escores
17 mais altos de TILs CD3+ e CD8+ intraepiteliais estão significativamente associados à maior
18 sobrevida em análises univariadas e multivariadas, enquanto os escores de TILs CD3+ e
19 CD8+ estromais não estão associados à sobrevida na análise univariada (WANG *et al.*,
20 2017).

21 No trabalho de Sato *et al.* (2005) os TILs estromais de todos os subtipos não se
22 correlacionaram com a melhora da sobrevida no câncer de ovário, e os autores salientam que
23 tais resultados sublinham a importância de avaliar a localização *in situ* precisa de TILs para
24 cada tipo de tumor.

1 Encontramos maior presença de células CD4 em neoplasias benignas quando
2 comparadas às neoplasias malignas. Os linfócitos T CD4 são células influenciadas pela
3 liberação de citocinas que podem transformá-las em reguladoras ou efetivas na eliminação
4 das células tumorais. O perfil Th1 de citocinas favorece a transformação destas células em
5 efectoras e atuam de forma a favorecer na diminuição das massas tumorais e aumentar a
6 sobrevida das pacientes com neoplasias malignas de ovário (LUKESOVA *et al.*, 2015).

7 Valmori & Ayyoub, (2015) avaliando tumores malignos de ovário evidenciaram
8 que os linfócitos T CD4 efetores estão presentes no estroma de tumores sólidos e conseguem
9 atuar na destruição das células tumorais pelo reconhecimento de antígenos expressos no
10 citoplasma celular. Essa interação do linfócito no microambiente tumoral favorece o
11 aumento da sobrevida das pacientes com câncer.

12 Estudos de Hamanishi *et al.* (2011) demonstraram que os casos de câncer ovariano
13 com melhor prognóstico foram caracterizados por altas taxas de infiltração de TILs CD4+.
14 está bem estabelecido que as TILs CD4+ são capazes de reconhecer antígenos de câncer e
15 podem amadurecer para se tornar células auxiliares Tipo-1 (Th1) e ativar macrófagos-M1
16 via interleucina-12 ou secreção de interferon-gama, ambos com atividade antitumoral,
17 embora o mecanismo permaneça não muito claro. Pinto *et al.* (2018) relacionou a infiltração
18 intraepitelial de T CD4+ em tecidos de neoplasias malignas de ovário com melhor
19 sobrevida.

20 Le Page *et al.* (2012) avaliaram linfócitos TCD4 intraepiteliais e demonstraram que
21 a presença de linfócitos TCD4+ foi correlacionada com maior sobrevida das pacientes com
22 câncer de ovário, o intervalo médio de progressão das pacientes com altas densidades de
23 linfócitos TCD4+ intra-epiteliais foi de 69 meses, em comparação com 59 meses para as
24 pacientes com baixa densidade destas células. Os autores confirmaram na população do
25 estudo que a alta densidade intraepitelial de linfócitos TCD4+ estava associada a um melhor

1 prognóstico. Resultados similares foram encontrados na avaliação do infiltrado tumoral por
2 Yang *et al.* (2018).

3 Em nosso estudo, ao compararmos a expressão de T CD8 no estroma das neoplasias
4 benignas e malignas epiteliais primárias de ovário, não houve diferença estatística nessa
5 comparação.

6 Nossos dados indicam que a maior expressão de células T CD8 está relacionada
7 com o subtipo molecular II do modelo de carcinogênese ovariana epitelial ($p=0,0227$), um
8 subtipo de tumores que progridem rapidamente e são altamente agressivos. Não foi
9 encontrada associação entre a presença ou ausência de células TCD8 e demais fatores
10 prognósticos.

11 Um estudo de Sato *et al.* (2005) indicou que o número de células T CD8 presentes
12 em tumores ovarianos está associada com prognóstico favorável do câncer de ovário. Nesse
13 estudo, a maior expressão de células T CD8 foi verificada no epitélio do tumor, não no
14 estroma tumoral, como foi no nosso estudo.

15 Tais dados se diferem de outro trabalho realizado por Zhang *et al.* (2015b) onde o
16 número de células T CD8 infiltrantes de tumores estava positivamente correlacionado com
17 maior estadiamento tumoral, no estroma e epitélio tumoral, além disso, o números de células
18 T CD4+ e CD8+ estavam aumentados nos tecidos de câncer de ovário em comparação com
19 aqueles nos tecidos ovarianos benignos. O fenótipo e a função das células Treg CD8 são
20 diferentes em diversos modelos de tumor. Os tumores podem secretar fatores solúveis que
21 promovem a indução, expansão e recrutamento de células Treg para o microambiente
22 tumoral (JARNICKI *et al.*, 2006; WANG, 2008; ZHANG *et al.*, 2015b). Assim como no
23 trabalho de Yildirim *et al.* (2017), infiltrações de linfócitos T CD8 no câncer epitelial de
24 ovário foram relacionadas com estadiamento avançado, tumor de alto grau e metástase.

1 Há a hipótese de que o crescimento de tumores em pacientes com câncer de ovário
2 induz a geração de células Tregs CD8+, onde os tumores poderiam secretar fatores solúveis
3 que promoveriam a indução, expansão e recrutamento de células Treg para o microambiente
4 tumoral. Porém, o fenótipo e a função dessas células podem se diferir em diversos modelos
5 tumorais (ZHANG *et al.*, 2015b).

6 Há discordância entre os estudos quando se avalia o papel de CD8 no prognóstico
7 de câncer de ovário. Um estudo indicou que o número de células T CD8 presentes no
8 epitélio de tumores ovarianos está associada com prognóstico favorável do câncer de ovário,
9 mas a avaliação foi epitelial, e não estromal (Sato *et al.*, 2005).

10 Tais discrepâncias podem ser parcialmente atribuídas a diferenças nas regiões da
11 população estudada, estroma ou epitélio, e na histologia de pacientes com câncer de ovário
12 (SATO *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2017).

13 Na avaliação de metástases em linfonodos, a não expressão imuno-histoquímica de
14 células CD20 associou-se à ausência de metástases linfonodais, sugerindo que tais células
15 possam estar presentes em um estágio da doença onde há metástase.

16 Sabe-se pouco sobre o papel das células B e sua contribuição para o nicho
17 metastático. Muito poucos estudos descreveram o panorama imunológico das metástases
18 humanas. Se as células B se comportam da mesma maneira em metástases de câncer de
19 ovário e como elas influenciam a resposta antitumoral é desconhecida (MONTFORT *et al.*,
20 2017). A literatura traz que as células B CD20 favorecem o desenvolvimento de uma
21 resposta imune antitumoral (KROEGER *et al.*, 2016; NIELSEN *et al.*, 2012; MONTFORT
22 *et al.*, 2017).

23 As células B infiltrantes de tumores parecem apoiar as respostas das células T ao
24 câncer. O papel dos TILs CD20+ na imunidade tumoral permanece pouco definido. Por
25 suposição, as células B infiltrantes de tumor poderiam intermediar seus efeitos através da

1 produção de anticorpos específicos de tumores (STONE *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*,
2 2012). Além de secretar anticorpos, as células B poderiam aumentar a imunidade
3 antitumoral através de mecanismos celulares, como, por exemplo, as células B podem servir
4 como células apresentadoras de antígeno (APC) às células T, facilitando as respostas dessas
5 células ao liberarem citocinas e quimiocinas que recrutam células T para os tecidos afetados
6 (RODRIGUEZ-PINTO, 2005; LEHNHARDT *et al.*, 2006).

7 A literatura traz muitos trabalhos avaliando TILs no câncer de ovário, muitas vezes
8 em tumores de ovário serosos de alto grau, e nem sempre no estroma tumoral. Nosso
9 trabalho se destacou ao comparar as populações de TILs entre as neoplasias malignas e
10 benignas de ovário, no estroma tumoral, região esta que é um microambiente específico
11 tumoral promotor da carcinogênese.

12 Além da determinação da presença de um tipo de infiltrado celular dentro do
13 ambiente do tumor, evidências sugerem que a localização e o padrão de infiltração do tumor
14 precisam ser considerados quando o assunto é prognóstico.

15 Também, apesar de uma origem celular comum, as neoplasias de ovário,
16 principalmente em estágio avançado, apresentam propriedades genéticas, biológicas, clínicas
17 e imunológicas heterogêneas e divergentes (TABASSUM & POLYAK, 2015; KROEGER *et*
18 *al.*, 2016).

19 O sistema imunológico desempenha um papel multifacetado e pode, em diferentes
20 contextos, promover ou inibir o crescimento tumoral. Se a presença da infiltração de células
21 imunológicas é, por si só, o mecanismo responsável pela piora ou melhora do prognóstico
22 ou simplesmente representa o resultado de outros processos moleculares ligados a desfechos
23 clínicos, ainda é desconhecido (Clarke, 2009).

1 O estudo mais aprofundado dos infiltrados específicos de células imunes, suas
2 combinações em diferentes regiões do tumor, se faz necessário, para ampliar os
3 conhecimentos atuais sobre a paisagem imunológica do câncer epitelial de ovário.

4 Esse estudo possui algumas limitações, e a principal é a heterogeneidade dos tipos
5 histológicos tumorais avaliados. Estudos com maior amostragem, onde seja possível
6 verificar a expressão de TILs conforme os subtipos moleculares e, histológicos, tanto no
7 epitélio, quanto no estroma tumoral para melhor caracterização dos infiltrados.

7. Conclusões

1 Em nosso trabalho, a maior expressão de CD3 foi encontrada no grupo de pacientes
2 com neoplasias malignas primárias de ovário quando comparado com o grupo de neoplasias
3 benignas, e maior expressão de células CD4 nas neoplasias benignas.

4 Ao relacionar a expressão de citocinas com fatores prognósticos, houve maior
5 expressão de células CD8 em pacientes com o subtipo molecular II do modelo de
6 carcinogênese ovariana epitelial, estando assim, sua expressão relacionada a um mau
7 prognóstico da doença. Na avaliação de metástases em linfonodos, a não expressão imuno-
8 histoquímica de células CD20 associou-se à ausência de metástases linfonodais, sugerindo
9 que possa desempenhar algum papel na presença de metástase.

Referências

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

AMIRA, G.; MORSI, A.; FAYEK, I.S.; MANSOUR, O.; NADER, H. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in recurrent platinum-sensitive ovarian cancer NCI case control study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 20, n.2, p.621-627, 2019.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2019**. Special Section: Ovarian Cancer. Atlanta, GA, 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>>.p:4;20. Acesso em: 28 de fevereiro de 2019.

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

ASHER, V.; LEE, J.; INNAMAA, A. et al. Preoperative platelet lymphocyte ratio as an independent prognostic marker in ovarian cancer. **Clinical & Translational Oncology**. v.13, n.7, p.499-503, 2011.

ASHRAFGANJOEI, T.; MOHAMADIANAMIRI, M.; FARZANEH, F. et al. Investigating preoperative hematologic markers for prediction of ovarian cancer surgical outcome. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.17, n.3, p.1445-1448, 2016.

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

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

BELOV, L.; de la VEJA, O.; dos REMEDIOS, C.G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. **Cancer Research**. v.61, n.11, p.4483-89, 2001.

BOUAZIZ, J.D.; YANABA, K.; VENTURI G.M. et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.104, n.52, p.20878-20883, 2007.

BOUGHERARA, H.; MANSUET-LUPO, A.; ALIFANO, M. et al. Real-time imaging of resident T cells in human lung and ovarian carcinomas reveals how different tumor microenvironments control T lymphocyte migration. **Frontiers in Immunology**. v.6, p.500, 2015.

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

BREMNES, R.M.; DØNNEM, T.; AL-SAAD, S. et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**. v.1, p.209-217, 2011.

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

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

CLARKE, B.; TINKER, A.V.; LEE, C.H. et al. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. **Modern Pathology**. v.22, n.3, p.393-402, 2009.

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

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

COUGHLIN, C.M.; VANCE, B.A.; GRUPP, S.A.; VONDERHEIDE, R.H. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. **Blood**. v.103, n.6, p.2046-54, 2004.

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

deVISSER K.E.; KORETS, L.V.; COUSSENS, L.M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell**. v.7, n.5, p.411-423, 2005.

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

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

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

ELLMARK P.; WOOLFSON, A.; BELOV, L.; CHRISTOPHERSON, R.I. The Applicability of a Cluster of Differentiation Monoclonal Antibody Microarray to the Diagnosis of Human Disease. **Methods in Molecular Biology**. v.439, p.199-209, 2008.

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

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

GLOBOCAN 2019 - **International Agency for Research on Cancer (IARC)/Cancer Registries International Agency for Research on Cancer, World Health Organization**. Lyon, France. v.1 p.2. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>> Acesso em: 14 de março de 2019.

HAMANISHI, J.; MANDAI, M.; ABIKO, K. et al. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. **Clinical Immunology**. v.141, n.3, p.338-347, 2011.

HAN, L.Y.; FLETCHER, M.S.; URBAUER, D.L. et al. HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. **Clinical Cancer Research**. v.14, n.11, p.3372-3379, 2008.

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

IGLESIA, M.D.; VINCENT, B.G.; PARKER, J.S. et al. Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**. v.20, n.14, p.3818-29, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, **Estimativa 2018-2019: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. p. 52,53,58, Rio de Janeiro, RJ, 2019. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>.

JAMMAL, M.P.; LIMA, C.A.; MURTA, E.F.C.; NOMELINI, R.S. Is Ovarian Cancer Prevention Currently Still a recommendation of Our Grandparents? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.39, n.12, p.676-685, 2017.

JARNICKI, A.G.; LYSAGHT, J.; TODRYK, S.; MILLS, K.H.; Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. **Journal of Immunology**. v.177, n.2, p.896-904, 2006.

JIA, L.; REN, J.M.; WANG, Y.Y. et al. Inhibitory role of prohibitin in human ovarian epithelial cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. v.7, n.5, p.2247-55, 2014.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews. Cancer**. v.6, n.5, p.392-401, 2006.

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

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

KROEGER, D.R.; MILNE, K.; NELSON, B.H. Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. **Clinical Cancer Research**. v.22, n.12, p.3005-3015, 2016.

KURMAN, R.J.; SHIH, IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer. Shifting the paradigm. **Human Pathology**. v.42, n.7, p.918-931, 2011.

KURMAN, R.J.; SHIH, IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. **The American Journal of Pathology**. v.2016186, n.4, p.733-47, 2016.

KURMAN, R.J.; SHIH, IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **The American Journal of Surgical Pathology**. v.34, n.3, p.433-443, 2010.

LABIDI-GALY, S.I.; PAPP, E.; HALLBERG, D. et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. **Nature Communications**. v.8, n.1, p.1093, 2017.

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

LE PAGE, C.; MARINEAU, A.; BONZA, P.K. et al. BTN3A2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis. **PLoS One**. v.7, n.6, p.e38541, 2012.

LEFFERS, N.; GOODEN, M.J.; de JONG, R.A. et al. Prognostic significance of tumorinfiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. **Cancer Immunology and Immunotherapy**. v.58, n.3, p.449-459, 2009.

LEHNHARDT, A.; MENGEL, M.; PAPE, L.; EHRICH, J.H.; OFFNER, G.; STREHLAU, J. Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. **American Journal of Transplantation**. v.6, n.4, p.847-851, 2006.

LEWIS K.E.; LU K.H.; KLIMCZAK A.M.; MOK S.C. Recommendations and Choices for BRCA Mutation Carriers at Risk for Ovarian Cancer: A Complicated Decision. **Cancers (Basel)**. v.10, n.2, p.1-11, 2018.

LIMA C.A.; JAMMAL, M.P.; MARTINS-FILHO, A. et al. Stromal Growth Differentiation Factor 15 and Its Association with Ovarian Cancer. **Gynecologic and Obstetric Investigation**. v.83, n.1, p.35-39, 2018.

LI, J.; WANG, J.; CHEN, R.; BAI, Y.; LU, X. The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. **Oncotarget**. v.8, n.9, p.15621-15631, 2017.

LIU, A.Y. Differential expression of cell surface molecules in prostate cancer cells. **Cancer Research**. v.60, n.13, p.3429-34, 2000.

LIU, A.Y.; TRUE, L.D. Characterization of prostate cell types by CD cell surface molecules. **The American Journal of Pathology**. v.160, n.1, p.37-43, 2003.

LUKESOVA, S.; VROBLOVA, V.; TOSNER, J. et al. Comparative study of various subpopulations of cytotoxic cells in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma. **Contemporary Oncology (Poznań, Poland)**. v.19, n.4, p. 290-299, 2015.

LUNDGREN, S.; BERNTSSON, J.; NODIN, B. et al. Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in epithelial ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**. v.9, n.21, s.p. 2016.

MAHMOUD, S.M.; LEE, A.H.; PAISH, E.C. et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.132, n.2, p.545-553, 2012.

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

MAVADDAT N.; PEOCK S.; FROST D. et al. EMBRACE. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **Journal of the National Cancer Institute**. v.105, n.11, p.812-22, 2013.

MILNE, K.; KÖBEL, M.; KALLOGER, S.E. et al. Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. **PLoS One**. v.4, n.7, p.e6412, 2009. Erratum in: **PLoS One**. v.8, n.7, 2009.

MILLIKEN, D.; SCOTTON, C.; RAJU, S. et al. Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. **Clinical Cancer Research**. v.8, n.4, p.1108-114, 2002.

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

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

MONTFORT, A.; PEARCE, O.; MANIATI, E.; et al. A Strong B-cell Response Is Part of the Immune Landscape in Human High-Grade Serous Ovarian Metastases. **Clinical Cancer Research**. v.23, n.1, p.250-262, 2017.

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

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

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

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

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

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

NIELSEN, J.S.; SAHOTA, R.A.; MILNE, K. et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**. v.18, n.12, p.3281-3292, 2012.

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

PEREIRA, P.N.; SARIAN, L.O.; YOSHIDA, A.; et al. Accuracy of the ADNEX MR scoring system based on a simplified MRI protocol for the assessment of adnexal masses. **Diagnostic and Interventional Radiology**. v.24, n.2, p.63-71, 2018.

PINTO, M.P.; BALMACEDA, C.; BRAVO, M.L. et al. Patient inflammatory status and CD4+/CD8+ intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. v.151, n.1, p.10-17, 2018.

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

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

READE C.J.; MCVEY R.M.; TONE A.A. et al. The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift. **Journal of obstetrics and gynaecology Canada**. v.36, n.2, p.133-140, 2014.

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

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

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

RÅDESTAD, E.; KLYNNING, C.; STIKVOORT, A. et al. Immune profiling and identification of prognostic immune-related risk factors in human ovarian cancer. **Oncoimmunology**. v.8, n.2, p.e1535730, 2018.

RODRÍGUEZ-PINTO D. B cells as antigen presenting cells. **Cellular Immunology**. v.238, n.2, p.67-75, 2005.

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

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

RYNER, L.; GUAN, Y.; FIRESTEIN, R. et al. Upregulation of Periostin and Reactive Stroma Is Associated with Primary Chemoresistance and Predicts Clinical Outcomes in Epithelial Ovarian Cancer. **Clinical Cancer Research**. v.21, n.13, p.2941-2951, 2015.

SATO, E.; OLSON, S.H.; AHN, J. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.102, n.51, p.18538-43, 2005.

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

SCHMELER, K.M.; SUN C. C.; BODURKA D. C. et al. Prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy compared with surveillance in women with BRCA mutations. **Obstetrics & Gynecology**. v.108, n.3, p.515-520, 2006.

SENTURK, E.; COHEN, S.; DOTTINO, P.R.; MARTIGNETTI, J.A. A critical re-appraisal of BRCA1 methylation studies in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**. v.119, n.2, p.376-383, 2010.

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

STONE, B.; SCHUMMER, M.; PALEY, P.J. Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. **International Journal of Cancer**. v.104, n.1, p.73-84, 2003.

TABASSUM, D.P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature Reviews. Cancer**. v.15, n.8, p.473-483, 2015.

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

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. IARC Press: Lyon 2003.

TERADA, K.Y.; AHN, H.J.; KESSEL, B. Differences in risk for type 1 and type 2 ovarian cancer in a large cancer screening trial. **Journal of Gynecologic Oncology**. v.27, n.3, p.e25, 2016.

VALMORI, D.; AYYOUB, M. CD4(+) T helper cell responses to NY-ESO-1 tumor antigen in ovarian cancer resist perversion into immunosuppressive Tregs. **Oncoimmunology**. v.4, n.12, p.e946370, 2014.

VAN CALSTER, B.; VAN HOORDE, K.; VALENTIN, L. et al. Evaluating the risk of ovarian cancer before surgery using the ADNEX model to differentiate between benign, borderline, early and advanced stage invasive, and secondary metastatic tumours: prospective multicentre diagnostic study. **British Medical Journal**. v.349, n.G5920, p.1-14, 2014.

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

VISVANATHAN, K.; SHAW, P.; MAY, B.J. et al. Fallopian tube lesions in women at high risk for ovarian cancer: a multicenter study. *Cancer Prev Res (Phila)*. **Cancer Prevention Research**. v.11, n.11, p.697-706. 2018.

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

WANG, Q.; LOU, W.; DI, W.; WU, X. Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8(+) tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer. **International Immunopharmacology**. v.52, p.7-14, 2017.

XU, Y.; HOU, Y.; LIU, T.; LOU, G. Overexpression and clinical significance of IBP in epithelial ovarian carcinoma. **Oncology letters**. v.15, n.5, p.6604-6610, 2018.

WANG, R.F. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. **Human Immunology**. v.69, n.11, p.811-814, 2008.

YANG, L.; WANG, S.; ZHANG, Q. et al. Clinical significance of the immune microenvironment in ovarian cancer patients. **Molecular Omics**. v.14, n.5, p.341-351, 2018.

YILDIRIM, N.; AKMAN, L.; ACAR, K. et al. Do tumor-infiltrating lymphocytes really indicate favorable prognosis in epithelial ovarian cancer? **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**. v.215, p.55-61, 2017.

ZHANG, F.; ZHANG, Z.L. The Diagnostic Value of Transvaginal Sonograph (TVS), Color Doppler, and Serum Tumor Marker CA125, CEA, and AFP in Ovarian Cancer. **Cell Biochemistry and Biophysics**. v.72, n.2, p.353-357, 2015.

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

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

ZHANG, S.; KE, X.; ZENG, S. et al. Analysis of CD8+ Treg cells in patients with ovarian cancer: a possible mechanism for immune impairment. **Cellular & Molecular Immunology**. v.12, n.5, p.580-591, 2015b.

ZEPPERNICK, F.; MEINHOLD-HEERLEIN, I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. **Archives of gynecology and obstetrics**. v. 290, p. 839-842, 2014.

ZOLA, H.; SWART, B.; NICHOLSON, I. et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. **Blood**. v.106, n.9, p.3123-26, 2005.

Artigos

ANEXO A

PROTOSCOLOS APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - UFTM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do estroma em neoplasia epitelial de ovário e sua relação com fatores prognósticos

Pesquisador: Rosekeila Simões Nomelini

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34770014.4.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triangulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 877.759

Data da Relatoria: 30/10/2014

Apresentação do Projeto:

O câncer de ovário

O câncer de ovário é uma causa comum de morte entre as neoplasias malignas ginecológicas. Cerca de três quartos dos tumores malignos de ovário apresenta-se em estadiamentos avançados no momento do diagnóstico inicial. É o câncer ginecológico de maior letalidade [1,2].

A maioria das pacientes se encontra em estadiamentos III e IV (FIGO) no momento do diagnóstico [3]. Nesses casos, a principal estratégia terapêutica é a cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia [4]. Apesar dos esquemas quimioterápicos derivados do platinum e, mais recentemente, dos taxanos, os resultados do tratamento não têm obtido melhora importante nas últimas décadas [5]. nos estadiamentos I e II, a sobrevida em 5 anos varia de 80 a 95%, enquanto que nos estadiamentos III e IV, essa percentagem é de apenas 5 a 15% [5-7].

Os marcadores tumorais são substâncias relacionadas à presença ou à progressão de um tumor. O CA – 125 (cancer antigen 125) é um biomarcador não específico para o câncer de ovário, podendo estar elevado no primeiro trimestre da gestação, endometriose, infecções pélvicas e outros tipos de câncer [8]. Mas se associado a outros como o CA - 15.3, CA - 72.4 e CA - 19.9, pode ter aplicação no manejo de massas anexiais [9]. O CA - 19.9 pode estar elevado no subtipo mucinoso, o beta-hCG pode estar aumentado nos tumores de origem germinativa e também no

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3318-5776

Fax: (34)3318-5776

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

coriorcarcinoma [10]. Murta et al. (2004) demonstraram a validade da associação de ultrassonografia e marcadores tumorais na identificação de neoplasias ovarianas, melhorando a sensibilidade e a especificidade como fator preditor de malignidade e conduzindo o cirurgião ao melhor tratamento [11]. Assim, a utilização de marcadores tumorais tem validade na diferenciação de massas ovarianas benignas e malignas, além de sugerir o subtipo histológico [12].

Rossi et al. (2004) estudaram o CA 125 como fator prognóstico (estudo retrospectivo de 82 pacientes), e demonstraram que esse marcador correlacionou com o estadiamento da FIGO, mas não com a idade, o grau, a doença residual após cirurgia, e intervalo livre de doença [13]. Santillan et al. (2005) avaliaram o risco de recidiva de câncer epitelial de ovário em pacientes com níveis séricos de CA125 menor que 35m U/ml, e demonstraram que um aumento progressivo de seus valores, mesmo ainda em níveis normais, poderia ser indicativo de recorrência da doença [14]. Paramasivam et al. (2005) mostraram que o estadiamento cirúrgico completo, o grau histopatológico e os níveis pré-operatórios de CA125 são fatores prognósticos independentes e poderiam ser incluídos como fatores de decisão da realização de quimioterapia [15]. Muramatsu et al. (2005) demonstraram que na avaliação de CA 125 e CA 19.9 séricos e do diâmetro tumoral em pacientes com estágio IA e IC, houve diferenças significativas entre os estádios [16].

Uma outra alternativa em estudo é a avaliação do microambiente tumoral intracístico. 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 de ovário [17,18].

Estudos mostram que outros marcadores podem ser usados nos diagnósticos das neoplasias ovarianas: HE4, GDF-15, Ca 72.4, Octamer-4, Nectin-4, progranulina. O GDF-15 atua como biomarcador de prognóstico potencialmente útil no carcinoma do ovário. O GDF-15 é induzido por citocinas inflamatórias, tais como interleucina-1 e fator de necrose tumoral. Seu aumento está associado a situações patológicas relacionadas à inflamação, lesão tecidual aguda, e malignidade [19]. O GDF-15 é membro da família TGF-beta, também chamada de citocina-1 inibidora de macrófagos (MIC-1), sendo originalmente identificado em linhagens celulares ativadas por macrófagos. O GDF-15 regula uma grande variedade de processos fisiológicos, como indução de apoptose e invasividade tumoral [20]. Concentrações elevadas também têm sido associadas a com um aumento do risco de eventos cardiovasculares em mulheres de idade avançada [21].

A progranulina é encontrada no cromossomo 17q, que pode promover a angiogênese e invasão tumoral. Pode existir uma relação entre os níveis séricos de progranulina e a sobrevida global e livre de doença em câncer epitelial de ovário [22]. Progranulina é um fator de crescimento que pode mediar a progressão do ciclo celular e a motilidade celular. Ela regula a inflamação; pode ter

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
Bairro: Nossa Sra. Abadia **CEP:** 38.025-100
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3318-5776 **Fax:** (34)3318-5776 **E-mail:** cep@pesqpg.uftm.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

ação anti-inflamatória, inibindo algumas ações do fator de necrose tumoral [23].

Citocinas

As citocinas são proteínas expressas pelo sistema imunológico determinantes na regulação da função, crescimento e diferenciação deste, apresentando funções-chave na defesa do hospedeiro. Interleucinas compõem um grande grupo das citocinas produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e células teciduais. Possuem grande variedade de funções, mas a maioria delas está envolvida na indução da divisão de outras células. As interleucinas são citocinas importantes no estudo da interação tumor-hospedeiro, possuindo propriedades pró ou antitumorais [24]. A inflamação crônica é associada a várias etapas da tumorigênese, incluindo a transformação, proliferação e invasão celular, angiogênese e metástase [25]. 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. Essa sinalização poderia inferir ou não em vantagens seletivas ao crescimento das células malignas [26,27].

Além da atividade tradicional da IL-2 na promoção do crescimento dos linfócitos T, ela também participa da ativação, crescimento e estímulo da função tumoricida das células NK [28]. Altos níveis de IL-2 significam aumento dos componentes do sistema imune no ataque contra as células cancerosas. Assim, a IL-2 é utilizada no tratamento de alguns cânceres [29,30]. A IL-6 influencia a função ovariana e no processo de ovulação, fertilização e implantação [31]. Pode estar associada à progressão tumoral através da apoptose de células malignas [32]. É relatada como fator prognóstico do câncer ovariano [33]. Produzidas por macrófagos, monócitos e linfócitos, as interleucinas 8 (IL-8) e 10 (IL-10) podem exercer vários efeitos sobre o sistema imune e estão relacionadas a angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas [34].

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, originalmente identificada como quimioatrativa de neutrófilos, esta citocina é produzida por células epiteliais, fibroblastos e tumorais, as quais também possuem receptores para esta interleucina [35]. Sua expressão em células do melanoma humano e do câncer ovariano está correlacionada ao potencial metastático do tumor [24,37,38].

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
Bairro: Nossa Sra. Abadia **CEP:** 38.025-100
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3318-5776 **Fax:** (34)3318-5776 **E-mail:** cep@pesqpg.uftm.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

A IL-10 é uma citocina multifuncional, produzidas pelos linfócitos Th2, 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 [39], as quais são capazes de produzir IL-8, acarretando a progressão da malignidade [34,40]. Estudo realizado por Llanes-Fernandez et al. (2009) evidenciou associação inversa entre a IL-10 e a p53, o que reflete o efeito supressor da IL-10 no microambiente do tumor, e sua associação inversa com um marcador de apoptose foi sugerido como indicativo do aumento da agressividade do tumor. Uma possível explicação para o resultado encontrado é o bloqueio da expressão de algumas citocinas pela p53, todavia a regulação negativa destas moléculas pode ser perdida quando há uma deficiência da p53 ocasionada, por exemplo, por mutações [38].

Enquanto algumas citocinas estimulam a proliferação e a invasão do câncer, outras, como os interferons, inibem este processo. O interferon gama (IFN- γ) é produzido principalmente pelas células Th1 CD4+, CD8+ e NK. Seu efeito antiproliferativo provavelmente é devido ao aumento da morte celular por estimular a atividade de algumas enzimas caspases e exercer atividade antiangiogênica [40] e antitumoral [33]. 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 [41,42].

Estroma em carcinoma epitelial de ovário

Um grande progresso tem ocorrido no entendimento do papel do sistema imune na progressão tumoral nos últimos anos. A presença de células mononucleares tumor-infiltrantes consiste em linfócitos T auxiliares e citotóxicas, células natural - killer, linfócitos B e macrófagos, demonstrando uma resposta imune ativa possivelmente direcionada contra os antígenos tumorais. A maioria das células T infiltrantes são linfócitos T CD8+ que poderiam mediar uma citotoxicidade específica contra células tumorais. Por outro lado, os macrófagos (células CD68) são importantes no recrutamento e ativação de linfócitos na presença desses antígenos. Porém, há uma heterogeneidade de macrófagos, podendo resultar em funções antagonistas, podendo inibir ou estimular a proliferação de células tumorais [43,44]. A presença de linfócitos-T infiltrantes (TIL) pode se correlacionar com melhor prognóstico em vários tumores, mas há resultados conflitantes da significância prognóstica de TIL em neoplasia maligna epitelial de ovário [45,46].

Na literatura, tem sido demonstrado que grande número de células T CD3+ são indicativas de uma

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3318-5776

Fax: (34)3318-5776

E-mail: cep@pesqpg.ufm.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

melhor sobrevida em neoplasia maligna de ovário [46,47], e que os linfócitos T CD-8+ são responsáveis por esse efeito [45,48,49]. Por outro lado, a presença de linfócitos T CD4+ regulatórios parecem reduzir a imunidade específica contra tumores, resultando em pobre sobrevida [50]. A localização de TILs nos tumores tem-se mostrado por ser importante fator prognóstico em câncer de ovário [45,51].

A infiltração de células imunes peri e intratumorais podem ser fatores preditores de resposta à quimioterapia [47,49]. Bösmüller et al. (2011) mostraram que a densidade de células T CD3+ e CD8+ no estroma tumoral pode ser um fator preditor da resposta à terapia baseada em platínio [52].

Linfócitos T CD4+ regulatórios (Treg) podem induzir a uma tolerância e suprimir a resposta imune, o que é feito através da secreção de TGF- β e interleucina 10 (IL-10), ou por contato direto célula-célula [50]. Os estudos demonstram uma propensão a localização dessas células na região peritumoral [53,54].

É bem estudado que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no comportamento do tumor. O estroma pode controlar o crescimento de tumores e invasão. Este compartimento tem uma grande influência relacionada com a resposta imune. A infiltração de células imunes em tumores pode até mesmo determinar a evolução e o prognóstico da doença, e a interação entre as células neoplásicas e o estroma é um fator crítico para o crescimento do tumor [55]. Por isso, o compartimento que será avaliado nesse estudo na imuno-histoquímica para TILs será o estromal.

Recentemente, estudos demonstraram que fibroblastos associados a carcinoma (CAFs) podem promover diretamente tumorigênese através de múltiplos mecanismos, incluindo a angiogênese, proliferação, invasão e supressão imune [56, 57]. Esses efeitos são mediados através da expressão e secreção de vários fatores de crescimento, como o TGF- β , VEGF e interleucina-8 (IL8) [58]. Esses efeitos são também estabelecidos pela modulação e status de diferenciação de células inflamatórias no microambiente tumoral [59]. Além disso, CAFs poderiam afetar a sensibilidade das células do tumor à quimioterapia e à radioterapia [60]. FAP e SMA são considerados marcadores para CAFs em vários tipos de tumores. A eliminação de CAFs in vivo através de uma vacina de DNA cujo alvo é a proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP) resultou em uma mudança do microambiente imune do padrão Th2 para Th1, melhorando os efeitos antimetastáticos da quimioterapia com doxorubicina em um modelo murino de câncer de mama [61]. FAP exercem um papel importante na predição da agressividade tumoral em pacientes com carcinoma epitelial de ovário após terapia neoadjuvante. CAFs podem exercer um importante papel

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
Bairro: Nossa Sra. Abadia **CEP:** 38.025-100
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3318-5776 **Fax:** (34)3318-5776 **E-mail:** cep@pesqpg.uftm.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

também na progressão do câncer e metástases, podendo ser alvo para novas estratégias terapêuticas [62, 63].

Dessa forma, parece existir um estreita relação entre CAFs e resposta imune tumoral, o que justifica o estudo dessa relação em neoplasias malignas epiteliais de ovário.

Objetivo da Pesquisa:

1. Investigar a expressão imunohistoquímica de dois marcadores de fibroblastos associados a carcinoma (CAFs), a alfa actina de músculo liso (SMA) e a proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP), no compartimento estromal de neoplasias benignas e malignas epiteliais de ovário.
2. Investigar a expressão imunohistoquímica citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 e TNF-alfa) e de linfócitos tumor-infiltrantes - TILs (CD3, CD4 e CD8) no estroma de neoplasias benignas e malignas epiteliais de ovário.
3. Relacionar a expressão de SMA e FAP com a expressão de citocinas e TILs no estroma de neoplasias malignas de ovário e com a dosagem dessas mesmas citocinas no soro e líquido intracístico.
4. Relacionar a expressão de SMA e FAP, e a expressão de citocinas e TILs no compartimento estromal com fatores prognósticos em carcinoma epitelial de ovário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos inerentes à pesquisa, já que os protocolos clínicos e cirúrgicos serão mantidos, o lavado peritoneal já faz parte da rotina do procedimento cirúrgico, e a punção do cisto de ovário será realizada após a exérese do mesmo, não prolongando em nada o tempo cirúrgico e nem interferindo no procedimento. O único desconforto devido à pesquisa poderá ser causado pela coleta de sangue, o que será minimizado por ser realizado por profissional habilitado e com as explicações pertinentes oferecidas às pacientes. O risco da perda de confidencialidade será prevenido 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. Considerando que a avaliação clínica e os elementos utilizados para o estudo são parte do diagnóstico e condutas terapêuticas de rotina,

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
Bairro: Nossa Sra. Abadia **CEP:** 38.025-100
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3318-5776 **Fax:** (34)3318-5776 **E-mail:** cep@pesqpg.uftm.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

não há riscos adicionais às pacientes referentes à pesquisa. Os benefícios são consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pendências atendidas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

pendências atendidas

Recomendações:

pendências atendidas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendências atendidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

UBERABA, 19 de Novembro de 2014

Assinado por:
ANA PALMIRA SOARES DOS SANTOS
(Coordenador)

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
Bairro: Nossa Sra. Abadia **CEP:** 38.025-100
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3318-5776 **Fax:** (34)3318-5776 **E-mail:** cep@pesqpg.ufbm.edu.br

ANEXO B

MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS 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

ANEXO C
DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NA IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ESTUDO

Anticorpo	Especificação	Diluição	Tampão/pH	Controle positivo
CD 3	Anti-CD3 <i>antibody</i> [NCL-L-CD3-565] Lot: 6024277 3.0g/L Novacastra™	1:400	Citrato/ pH 6.0	Amígdala
CD 4	Anti-CD4 <i>antibody</i> [NCL-L-CD4-1F6] Lot: 6005992 3.4g/L Novacastra™	1:25	Tris-EDTA/ pH 9.0	Amígdala
CD 8	Anti-CD8 <i>antibody</i> [NCL-L-CD4-295] Lot: 6009339 3.1g/L Novacastra™	1:100	Citrato/ pH 6.0	Amígdala
CD 20	Anti-CD20 <i>antibody</i> [NCL-L-CD20-L26] Lot: 6008164 10.5g/L Novacastra™	1:400	Citrato/ pH 6.0	Amígdala

Fonte: O Autor.

ANEXO D TAMPÕES E REAGENTES UTILIZADOS EM IMUNO-HISTOQUÍMICA

✓ **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.

✓ **Tampão TRIS/EDTA pH 9.0:**

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

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

✓ **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. 5mL 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.

✓ **Solução diluente para anticorpo primário (BSA):**

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

OPÇÃO (DAKO-53022).

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira.

✓ **Solução de água oxigenada a 3%:**

3mL de água oxigenada 30 volumes + 97mL de água destilada.

ANEXO E
CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES OVARIANOS SEGUNDO A
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

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

