

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

LUCIANO ELIZIÁRIO BORGES JÚNIOR

**ANÁLISE DE FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS
RECEPTORES EM SORO E LÍQUIDO INTRACÍSTICO EM
NEOPLASIAS DE OVÁRIO**

**UBERABA MG
2017**

LUCIANO ELIZIÁRIO BORGES JÚNIOR

**ANÁLISE DE FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS
RECEPTORES EM SORO E LÍQUIDO INTRACÍSTICO EM
NEOPLASIAS DE OVÁRIO**

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

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

**UBERABA MG
2017**

**ANÁLISE DE FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS
RECEPTORES EM SORO E LÍQUIDO INTRACÍSTICO EM
NEOPLASIAS DE OVÁRIO**

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

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

Coorientadores: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta e Prof^ª. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta

25 de abril de 2017

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Milena Prata Jammal
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^ª. Dra. Angélica Lemos Debs Diniz
Universidade Federal de Uberlândia

“Ser importante é do ego, ser feliz é da alma”

Autor Anônimo

Dedico este trabalho à Sra. Neli Aparecida Romualdo Borges minha amada mãe, onde quer que esteja, sempre me ilumina, sempre guia cada passo, cada respiração e cada movimento que faço em minha vida.

AGRADEÇO

A Deus pois, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

*À minha esposa **Ana Paula Felice Fontes**, por sempre estar presente ao meu lado mesmo com tantas adversidades que tenhamos passado, pelo apoio, carinho, amor, generosidade, companheirismo e dedicação, e por ter dado o “meu tudo” que é a nossa filha **Catarina Fontes Borges**.*

*Ao meu irmão **Leonardo Romualdo Borges**, maior fonte de sabedoria e humildade que conheço e o meu 1º grande incentivador na área médica, a pessoa que sempre esteve comigo ao longo de seus 38 anos e que sempre acreditou em mim.*

*Ao meu pai **Luciano Eliziário Borges**, minha tia mãe **Abadia Aparecida Romualdo**, à minha querida 3ª mãe **Leila Cristina de Sousa**, à minha irmã **Luciana Cristina de Sousa Borges**, ao meu sogro **Wellington Luiz Fontes** e à minha sogra **Ana Rosa Felice Fontes** por me aconchegarem em seus braços quando precisei, por permitirem chegar a esse momento, seja por um abraço, por uma palavra ou por, simplesmente, estarem no lugar certo e no momento que sempre precisei.*

*À professora **Dra. Rosekeila Simões Nomelini**, minha amiga, minha ex-residente e hoje com muito orgulho minha professora orientadora, pela oportunidade, pela transmissão do seu conhecimento e, principalmente, pela paciência e força ao longo desses anos. Serei eternamente grato pelo que fez por mim.*

*Ao professor **Dr. Eddie Fernando Cândido Murta** e professora **Dra. Beatriz Martins Tavares Murta** pela orientação e sempre demonstrarem profissionalismo e seriedade.*

*A todos meus amigos de pós graduação pela imensurável ajuda ao longo desses dois anos, em especial ao estimado **Cid Almeida Lima** por ter sido, dentre todos, aquele que mais próximo esteve.*

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

A todos os meus alunos e residentes, fonte da minha inspiração na docência, àqueles que em minhas manhãs cansadas e de abatimento, com uma simples palavra ou uma simples pergunta e com total interesse me reergueram e mostraram-me o porquê de estar ali.

A todos os pacientes que já passaram por mim, que sempre na vigência de suas dores e incertezas foram a essência para a minha formação como homem e profissional.

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

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

INTRODUÇÃO: O câncer de ovário é um grande desafio para oncologistas ginecológicos. Apesar de uma vasta quantidade de pesquisa clínica e laboratorial, melhoria nas técnicas cirúrgicas e um arsenal cada vez maior de agentes quimioterápicos, o câncer de ovário ainda permanece sendo a malignidade ginecológica mais letal e uma das principais causas de morbidade para a maioria daquelas que sofrem com a doença. Há uma necessidade importante do desenvolvimento de novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico dessa neoplasia, que podem também servir como alvos de novas modalidades terapêuticas.

OBJETIVOS: Os objetivos do estudo foram comparar a dosagem de TNF- α e de seus receptores solúveis (sTNF-1R1 e sTNF-R2) no soro e líquido intracístico entre o grupo de neoplasias benignas e o de neoplasias malignas primárias de ovário; relacionar a dosagem de TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2 no soro e no líquido intracístico de pacientes com neoplasia maligna de ovário com fatores prognósticos clínicos e patológicos.

MATERIAL E MÉTODOS: Sessenta e três pacientes foram avaliadas no Ambulatório de Massa Pélvica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e submetidas à cirurgia de acordo com critérios pré-determinados, sendo 17 neoplasias malignas e 46 neoplasias benignas. A quantificação de TNF- α e de seus receptores solúveis sTNF-R1 e sTNF-R2 no soro e no líquido intracístico foi realizada pelo método ELISA. A coleta do soro foi realizada no pré-operatório. Os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados foram expressos em medianas e percentis. Os resultados entre os grupos não pareados (neoplasias benignas e malignas) foram comparados através de teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS: A dosagem de TNF-R2 intracístico foi significativamente mais alta nas neoplasias malignas quando comparado com as neoplasias benignas ($p=0.0235$). Não houve significância estatística nas comparações de TNF e TNF-R1 no líquido intracístico, e nem nas dosagens séricas. Na avaliação dos fatores prognósticos, valores maiores de TNFR2 intracístico estiveram relacionados a câncer de ovário tipo II com tendência à significância ($p=0.0823$). Valores maiores de TNFR2 intracístico estiveram relacionados a graus de diferenciação 2 e 3 ($p=0.0087$). Não houve significância estatística na avaliação ao estadiamento.

CONCLUSÃO: A dosagem de TNF-R2 intracístico é mais alta em neoplasias malignas quando comparado com as neoplasias benignas de ovário. Além disso, valores maiores de TNFR2 intracístico estiveram relacionados a câncer de ovário tipo II e a graus de diferenciação 2 e 3, o que sugere que esse receptor solúvel pode ser um potencial marcador de mau prognóstico em câncer de ovário, podendo alvo de futuras pesquisas de terapias-alvo seletivas anti-TNFR2.

Palavras-chave: TNF-alfa, sTNF-R1, sTNF-R2, tumor de ovário, fatores prognósticos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ovarian cancer is a major challenge for gynecological oncologists. Despite a vast amount of clinical and laboratory research, improvement in surgical techniques and an increasing array of chemotherapeutic agents, ovarian cancer still remains the most lethal gynecological malignancy and a leading cause of morbidity for the majority of those suffering with the disease. There is an important need for the development of new biomarkers for the diagnosis and prognosis of this neoplasia, which may also serve as targets for new therapeutic modalities.

OBJECTIVES: The objectives of the study are to compare the dosage of TNF- α and its soluble receptors (sTNF-1R1 and sTNF-R2) in the serum and intracellular fluid between the group of benign neoplasms and that of primary ovarian malignancies and to relate the dosage of TNF- α , sTNF-1R1 and sTNF-R2 in serum and intracellular fluid of patients with malignant ovarian neoplasia with clinical and pathological prognostic factors.

MATERIALS E METHODS: Sixty three patients were evaluated at the Pelvic Mass Ambulatory of the Federal University of the Triângulo Mineiro (UFTM) and submitted to surgery according to predetermined criteria, 17 malignant neoplasms and 46 benign neoplasms. Quantification of TNF- α and its soluble sTNF-R1 and sTNF-R2 receptors in serum and intracellular fluid was performed by the ELISA method. Serum collection was performed preoperatively. The data were analyzed statistically. The results were expressed in medians and percentiles. Results between the unpaired groups (benign and malignant neoplasms) were compared by Mann-Whitney test. The evaluation of prognostic factors was performed using the chi-square test, with significance level lower than 0.05. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS: Intracystic TNF-R2 levels were significantly higher in malignant neoplasms compared to benign neoplasms ($p = 0.0235$). There was no statistical significance in the comparisons of TNF and TNF-R1 in the intracellular fluid, nor in serum dosages. In the evaluation of prognostic factors, higher intracystic TNFR2 values were related to type II ovarian cancer with a tendency to significance ($p = 0.0823$). Higher intracystic TNFR2 values were related to degrees of differentiation 2 and 3 ($p = 0.0087$). Statistical evaluation was not statistically significant.

CONCLUSION: Intracellular TNF-R2 dosage is higher in malignant neoplasms when compared to benign ovarian neoplasms. In addition, higher intracellular TNFR2 values were related to type II ovarian cancer and degrees of differentiation 2 and 3, suggesting that this soluble receptor may be a potential marker of poor prognosis in ovarian cancer, and may be the subject of future research Selective anti-TNFR2 therapies.

Keywords: TNF-alpha, sTNF-R1, sTNF-R2, ovarian tumor, prognostic factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig1- Características ultrassonográficas das massas ovarianas entre o grupo de neoplasias ovarianas benignas e o grupo de neoplasias ovarianas malignas50
- Figura 2- Classificação do estadiamento das pacientes com neoplasia maligna segundo a FIGO 2014.....52
- Figura 3- Grau de diferenciação entre as pacientes com neoplasias malignas.....53
- Figura 4: Níveis de TNF-alfa (pg/ml) e seus receptores TNF-R1 e TNF-R2 no líquido intra-cístico de pacientes com neoplasias benignas e malignas de ovário.....54
- Figura 5: Níveis de TNF-alfa (pg/ml) e seus receptores TNF-R1 e TNF-R2 no soro pré-operatório de pacientes com neoplasias benignas e malignas de ovário.....56
- Figura 6- Os níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intra-cístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas relacionadas aos tipos I e II de acordo com a classificação de SHIHS 2010, * p = 0,08 versus tipo I (Mann-Whitney).....57
- Figura 7- Níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intra-cístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas relacionadas, grau histológico; ** p = 0,0087 vs. grau 1 (Mann-Whitney).....59
- Figura 8- Níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de fluido intra-cístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas relacionando-as ao estadiamento tumoral - FIGO (Mann-Whitney).....60
- Figura 9- Níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatórios obtidas de pacientes com neoplasias malignas relacionadas aos tipos I e II de acordo com a classificação de SHIHS 2010 (Mann-Whitney).....61
- Figura 10- Níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatório obtidas de pacientes com neoplasias malignas relacionando-as ao grau histológico (Mann-Whitney).....63

Figura 11- Os níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré operatório obtidas de pacientes com neoplasias malignas relacionando-as ao estadiamento tumoral - FIGO (Mann-Whitney).....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos tumores ovarianos malignos. Adaptado de World Health Organization Classification of Tumours, 2003 (TAVASSOLI, DEVILEE, 2003).26

Tabela 2 - Estadiamento cirúrgico FIGO do câncer ovariano. *Adaptado de The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer (ZEPPERINICK, MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).....29

Tabela 3 - Características dos dois grupos de pacientes comparados no estudo.....49

Tabela 4 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia benigna.....51

Tabela 5 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia maligna.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AFP – Alfa fetoproteína

BRCA1 - Gene supressor de tumor *breast cancer 1*

BRCA2 - Gene supressor de tumor *breast cancer 2*

CA- 19.9 - Antígeno do câncer 19.9

CA125 - Antígeno do câncer 125

CA-15.3 - Antígeno do câncer 19.9

CD - *Cluster of Differentiation*

CEA - Antígeno carcinoembrionário

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fig - Figura

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FoxP3+ - Forkhead box P3

G1 – Grau 1

G2 – Grau 2

G3 – Grau 3

HC – UFTM – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

HRP - Estreptavidina conjugada com peroxidase

IFN- γ - Interferon gama

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

INCA – Instituto Nacional de Combate ao Câncer

IOTA - *International Ovarian Tumour Analysis*

IPON - Instituto de Pesquisa em Oncologia

pg/ml – Picogramas por mililitros

RNL – Relação neutrófilo sobre linfócito

Tab - Tabela

TGF- β 1 - Fator de transformação do crescimento beta 1

TH – Terapia Hormonal

TILs - Linfócitos que infiltram tumores

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF-R – Receptor do fator de necrose tumoral

TNF-R1 – Receptor R1 do fator de necrose tumoral

TNR-R2 – Receptor R2 do fator de necrose tumoral

sTNF-R1 - Receptor solúvel R1 do fator de necrose tumoral

sTNR-R2 - Receptor solúvel R2 do fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Tregs – Células T regulatórias

Tu - Tumor

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

US - Ultrassom

β -hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	<i>O CÂNCER DE OVÁRIO</i>	<i>22</i>
1.2	<i>PREVALÊNCIA, INCIDÊNCIA, MORTALIDADE.....</i>	<i>23</i>
1.3	<i>FATORES DE RISCOS E ETIOPATOGENESE.....</i>	<i>24</i>
1.4	<i>CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE OVÁRIO.....</i>	<i>25</i>
1.5	<i>DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE OVÁRIO.....</i>	<i>27</i>
1.6	<i>ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO.....</i>	<i>28</i>
1.7	<i>TRATAMENTO E SOBREVIVÊNCIA DO CÂNCER DE OVÁRIO.....</i>	<i>31</i>
1.8	<i>FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE OVÁRIO.....</i>	<i>31</i>
1.9	<i>MARCADORES TUMORAIS E CÂNCER DE OVÁRIO.....</i>	<i>32</i>
1.10	<i>IMUNOLOGIA TUMORAL, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-ALFA) E SEUS RECEPTORES.....</i>	<i>33</i>
2	HIPÓTESE.....	37
3	OBJETIVOS.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	<i>PACIENTES.....</i>	<i>42</i>
4.1.1	<i>Critérios De Indicação De Laparotomia Exploradora.....</i>	<i>42</i>
4.1.2	<i>Caracterização Dos Grupos.....</i>	<i>43</i>
4.1.3	<i>Critérios De Inclusão.....</i>	<i>43</i>
4.1.4	<i>Critérios De Exclusão.....</i>	<i>43</i>
4.2	<i>MÉTODOS.....</i>	<i>44</i>
4.2.1	<i>Análise Dos Dados.....</i>	<i>44</i>
4.2.2	<i>Estudo Anátomo-Patológico.....</i>	<i>44</i>
4.2.3	<i>Coleta Do Líquido Intracístico.....</i>	<i>44</i>

4.2.4	Dosagem de TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2 no plasma.....	45
4.2.5	Análise imuno-enzimática.....	45
4.2.6	Análise estatística	46
4.2.7	Redação do texto.....	46
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO.....	71
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9	ANEXOS.....	83
9.1	<i>ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</i>	84
9.2	<i>ANEXO B – Aprovação pelo CEP</i>	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE OVÁRIO

Segundo o INCA (2016), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.

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

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

As mudanças no número de casos parecem não ser atribuídas a uma melhor compreensão da doença, na melhoria das técnicas de diagnóstico, ou no envelhecimento da

população. As razões não são claras, mas é possível que o ambiente ou fatores sociais, tais como a diminuição do tamanho da família, menarca precoce, menopausa tardia e idade avançada desempenhem um papel importante (DALY et al., 1998; MARSDEN et al., 2000). Cerca de 90% dos cânceres de ovário são esporádicos, isto é, não apresentam fator de risco reconhecido. Cerca de 10% apresentam um componente genético ou familiar. As mulheres que possuem mutações deletérias nos genes BRCA1 ou BRCA2 representam o subgrupo com maior risco de apresentar câncer de ovário. Entre as mulheres com mutações de BRCA1 (cromossomo 17q21), o risco tende a aumentar pouco antes dos 40 anos e, ao longo da vida, entre 25% a 40% (SCHMELER et al., 2006). As mulheres portadoras de mutações no gene BRCA2 (cromossomo 13q12) também têm um importante risco de desenvolver câncer de ovário, cerca de 15 a 25%, embora esse risco não parece aumentar até pouco antes de 50 anos de idade (SGO, 2005; SCHMELER et al., 2006). Tanto BRCA1 como BRCA2 são genes supressores de tumores que são herdados de maneira autossômica dominante (CHOBANIAN et al., 2008). História familiar é o fator de risco isolado mais importante (INCA, 2016).

1.2 PREVALÊNCIA, INCIDÊNCIA, MORTALIDADE

A prevalência mundial do câncer de ovário é de cerca de meio milhão de mulheres em um período de cinco anos; aproximadamente outros 200.000 novos casos ocorrem a cada ano com pico de incidência da doença está no início da sexta década de vida. Os dados de prevalência acumulada ao longo da vida, desde o nascimento até 85 anos de idade, mostram que a probabilidade de ocorrência do câncer de ovário é de 1,5%. (WHITTEMORE AS, 1994; SANKARANARAYANAN R, 2006; OMURA et al., 1991).

O câncer de ovário é responsável por cerca de 3% de todos os cânceres entre as mulheres e sua incidência tem diminuído em 1,0% por ano desde 1992 (AMERICAN CANCER

SOCIETY, 2013). Mais mulheres morrem de câncer de ovário do que de todos os outros tumores ginecológicos juntos (HOLSCHNEIDER et al., 2000) e a taxa de mortalidade em mulheres idosas é maior em comparação com mulheres mais jovens (OMURA et al., 1991).

Cerca de 22.440 novos casos são estimados para os Estados Unidos da América em 2016, ocupando a 11ª posição na incidência entre todas as neoplasias malignas no sexo feminino e com uma estimativa de 14.240 mil mortes, sendo a 5ª causa de morte por câncer em mulheres nos Estados Unidos, correspondendo à 5% de todas as mortes (SIEGEL et al, 2016).

A incidência do câncer de ovário é mais elevada nos países industrializados sendo o risco de uma mulher de um país ocidental vir a desenvolver uma neoplasia ovariana é de cerca de 1:70 (MARSDEN et al., 2000), embora concentre o maior número de casos nos países em desenvolvimento. Na América Latina, a incidência aproxima-se daquela dos países desenvolvidos, porém nos países em desenvolvimento como um todo, no entanto, a incidência é mais baixa.

Dados recentes e nacionais (INCA 2016) apontam uma estimativa de 6.150 novos casos/ano e 3.283 casos de morte/ano no Brasil. A incidência do câncer de ovário supera a dos países industrializados em Porto Alegre e em São Paulo (SANKARANARAYANAN R , 2006)

1.3 FATORES DE RISCOS E ETIOPATOGENESE

A etiologia do câncer de ovário permanece obscurecida, porém vários fatores de risco parece ter correlação. FATHALLA em 1971 propôs a teoria clássica da etiopatogênese do Câncer de Ovário originado a partir de microtraumas na superfície ovariana após incessantes ovulações, portanto longos períodos de anovulação , independente da idade, superior ou inferior a 55 anos, contribuem para que o risco de carcinoma epitelial ovariano diminua como gravidez a termo, uso de anticoncepcional oral e amamentação. Seguindo o mesmo raciocínio paciente

apresentando menarca precoce, menopausa tardia e pacientes inférteis submetidas a longos períodos de indução da ovulação (maior que doze meses), possuem risco aumentado de câncer de ovário. (WHITTEMORE *et al.*, 1992).

RISCH *et al.*, 2001 descreve que uma porcentagem pequena de casos de câncer de ovário possui componente genético ou familiar que leva a predisposição à doença. O grupo com maior probabilidade de desenvolvimento do câncer de ovário de origem genética são as mulheres que possuem mutações deletérias nos genes BRCA1 ou BRCA2 ou que possuem mãe ou irmã com mutação genética representam (GAYTHER *et al.*, 1999; HORIUCHI *et al.*, 2003). Entre as mulheres com mutações de BRCA1 (cromossomo 17q21), o risco tende a aumentar entre 25% a 40%, já as com mutações no gene BRCA2 (cromossomo 13q12) entre 15 a 25% (SCHMELER *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos, outras teorias foram surgindo para explicar a etiopatogênese do câncer de ovário. A teoria mais atual correlaciona o carcinoma seroso de ovário seria originado a partir do carcinoma seroso intraepitelial da tuba de Falópio, cujas células se implantariam no ovário, haveria uma implantação direta de células do epitélio das fimbrias da tuba para a superfície do ovário, em áreas de epitélio roto pela ovulação e assim transformando no carcinoma epitelial ovariano. (KURMAN E SHIHS 2010) (KURMAN E SHIHS 2011).

1.4 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE OVÁRIO

O Câncer de Ovário possui um grande variação histológica, sendo geralmente originado a partir de três tipo de células (células epiteliais, células do cordão sexual / estroma, células germinativas) (TAVASSOLI, DEVILEE, 2003). (Tab.1)

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

Tumores ovarianos		
Tumores da superfície epitelial-estromal	Tumores dos cordões sexuais-estromais	Tumores das células 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		

Os carcinomas serosos são os mais comuns, correspondendo a mais de 2/3 dos tumores ovarianos, podendo ser bem diferenciados com baixo grau de malignidade ou de alto grau de histológico sendo essa a forma mais comum de apresentação. Existem ainda os tumores *boderline* geralmente associados aos tumores de baixo grau de malignidade. (BELL ET AL 2004) (FERREIRA ET AL 2012)

KURMAN & SHIHS (2010) separam os tumores em dois tipos, denominados tipo I, que inclui essencialmente carcinomas serosos e endometrioides bem diferenciados, carcinoma de células claras e transicionais, geralmente diagnosticados no estadiamento IA, geralmente associa-se à tumores *borderline*. Já os tumores do tipo II representados pelos

tumores serosos de alto grau histológico (graus 2 ou 3), carcinoma indiferenciado, carcinosarcoma ou tumor mesodérmico misto são agressivos, de alto grau histológico, quase sempre diagnosticados em estádios avançados.

1.5 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE OVÁRIO

O Câncer de Ovário mostra-se assintomático na sua fase inicial ou sem causar sintomas específicos. À medida que a doença se desenvolve, começam a surgir sintomas como dor ou aumento do volume abdominal; náuseas, dispepsias, constipação ou diarreia, astenia, adinamia, disúria, polaciúria, sangramento vaginal e perda de peso. A doença ainda pode se manifestar com ascite neoplásica ou ainda com abdome agudo obstrutivo e derrame pleural. (AC CAMARGO 2010, INCA 2016).

A sensibilidade e a especificidade do exame ginecológico para o rastreamento de neoplasias ovarianas são questionáveis (MURTA et al., 2004; PADILLA et al., 2005). A ultrassonografia pode ajudar no diagnóstico de tumores ovarianos e na diferenciação entre tumores neoplásicos e não neoplásicos (MINARETZIS et al., 1994, OSMERS et al., 1998), além de fornecer informações importantes, tais como o tamanho e conteúdo destes tumores e pode ser usada para diferenciá-los entre malignos e benignos (NARASIMHAN, 2008). A ultrassonografia transvaginal associada com a imagem colorida com Doppler pode aumentar a sua especificidade (GUERRIERO et al., 2005; SZPUREK et al., 2005), possibilitando a avaliação da condição vascular do tumor e o fluxo sanguíneo (RIVOIRE, 2006). Porém, o diagnóstico precoce de câncer ovariano pela ultrassonografia ainda é controverso devido à sua baixa prevalência na população geral (FISHMAN et al., 2005) e também por ocorrerem falhas na detecção de tumores em estágio inicial (OLIVIER et al., 2006), dificultando o seu rastreamento.

Durante a última década, grandes progressos foram feitos na busca de se padronizar e aperfeiçoar a classificação das massas anexiais, através dos exames de ultrassonografia, pelo grupo IOTA (*International Ovarian tumour Analysis*) (NUNES *et al.*, 2014). Alguns protocolos vêm sendo elaborados utilizando dados ultrassonográficos a fim de estabelecer o diagnóstico de câncer de ovário. Através dos modelos matemáticos desenvolvidos pelo grupo ADNEX, foi possível prever o diagnóstico das quatro categorias principais do câncer de ovário: tumores benignos, tumores *borderline*, tumores primários de ovário e câncer metastático secundário (VAN CALSTER *et al.*, 2014).

1.6 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO

O diagnóstico e estadiamento do câncer de ovário são cirúrgicos. O procedimento padrão para o estadiamento inclui citologia oncótica do líquido ascítico ou lavado peritoneal, inspeção cuidadosa de toda superfície peritoneal (parietal e visceral), biopsias ou ressecção das aderências, omentectomia infracólica; caso não sejam visualizados implantes: biópsia aleatória do peritônio vesical, fundo de saco, goteiras parieto-cólicas e infra-diafragmático bilateral; histerectomia total e salpingooforectomia bilateral (tumor deve ser removido sem rompimento de cápsula); ressecção das áreas suspeitas; linfadenectomia pélvica e retroperitoneal sistemáticas. (INSTITUTO AC CAMARGO 2014).

O estadiamento do câncer de ovário sofreu transformação ao longo dos anos desde o estadiamento clássico de 1988 até o estadiamento atualizado preconizado pela FIGO 2014, adaptado de The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer (ZEPPELNICK, MEINHOLD-HEERLEIN, 2014), o qual está descrito abaixo. (Tab. 2)

Tabela 2 - Estadiamento cirúrgico FIGO do câncer ovariano. *Adaptado de The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer (ZEPPERLICK, MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

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

Estadio 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

Estadio 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

Estadio 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

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

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

Estadio 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

Estadio IIIA1: Somente linfonodos retriperitoneais 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

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

Estadio 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)

Estadio 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)

Estadio IV – Metástases à distância excluindo metástases peritoniais

Estadio IVA: O derrame pleural com citologia positiva

Estadio 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 Estágio 1 para Estágio II.

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

*O sistema de estadiamento do câncer ovariano é estabelecido pela International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) e se baseia nos resultados obtidos no momento da cirurgia.

1.7 TRATAMENTO E SOBREVIDA DO CÂNCER DE OVÁRIO

A principal estratégia terapêutica é a cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia. Apesar dos esquemas quimioterápicos derivados do *platinum* e dos taxanos, a sobrevida em 5 anos nos estadiamentos III e IV é de apenas 5 a 15%, enquanto que nos estádios I e II varia de 80 a 95%. A diferenciação dos processos expansivos ovarianos em benignos e malignos é crucial para que o clínico possa selecionar e aperfeiçoar o tratamento (MAYER et al., 1992; KEHOE et al., 1994; YAWN et al., 2001).

A sobrevida das pacientes está correlacionada com o estadiamento da doença na época do diagnóstico e com a doença residual após a primeira cirurgia (ZANETTA, et al., 1998). A taxa de sobrevida geral, em 5 anos, é de 50%, com 95% de sobrevida para paciente com neoplasia restrita aos ovários (estadiamento I), 79% naquelas com doença infiltrada em tecidos adjacentes aos ovários (estadiamento II) e de 28% naquelas com estágio clínico avançado (estadiamento IV) (SMITH, 2001).

1.8 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE OVÁRIO

É fundamental avaliar os fatores prognósticos para auxiliar no tratamento e na descoberta de novas armas terapêuticas dessa doença, que ainda se resumem na quimioterapia e na cirurgia.

Estudos recentes têm demonstrado a importância da participação da resposta inflamatória do paciente na carcinogênese e progressão do câncer, tendo sido notório o efeito negativo dos neutrófilos de forma a colaborar com a evolução do câncer, agindo na promoção da angiogênese e imunossupressão, assim como na migração, invasão e metástase (DUMITRU et al, 2013). Sendo assim, a neutrocitose e a elevada relação de neutrófilos por linfócitos no

sangue (RNL) têm sido associadas a um mau prognóstico clínico no câncer de ovário (DONSKOV, 2013).

YESILYURT H, et al 2014 demonstraram que diâmetro pré-operatória da massa, CA125, duração da menopausa, e proporção de neutrófilos / linfócitos podem ser utilizados como fatores pré operatórios de predição em tumores ovarianos de células da granulosa.

OZAKSIT et al. (2015) concluíram que a relação plaqueta/linfócito também pode ser utilizada como fator prognóstico pré-operatório em pacientes adolescentes portadoras de neoplasias ovarianas. Resultado semelhante estabelecido pelo mesmo autor aconteceu ao analisar a idade e o índice de massa corporal dessas pacientes, podendo ser estes também utilizados como fatores prognósticos.

Outro parâmetro utilizado para avaliação dos fatores prognósticos são os marcadores tumorais. GUNDOGDU et al., (2011), demonstraram que o CA-125 pode ser usado como marcadores para prever o risco de recidiva precoce, ao demonstrarem uma relação entre os níveis de CA 125 e tumores ovarianos serosos, endometrióides e de células claras em estadiamentos avançados III e IV.

1.9 MARCADORES TUMORAIS E CÂNCER DE OVÁRIO

Marcadores tumorais são substâncias encontradas no organismo de pessoas portadoras de neoplasias ovarianas, podendo ou não ser produzida pelo próprio tumor ou se manifestando como uma resposta à presença do mesmo. Os marcadores tumorais têm sua importância no diagnóstico de neoplasia ovariana, e seus níveis devem refletir com precisão a evolução clínica e a regressão da doença, e a normalização dos seus níveis deve estar associada à cura (REIS, 2005). Devem ser sensíveis e específicos e ainda apresentar níveis

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

Os marcadores tumorais séricos de rotina utilizados na prática clínica para a avaliação de neoplasias ovarianas são: Antígeno Carcinoembrionário (CEA), CA-125, CA-19.9, CA-15.3, Alfa-fetoproteína (AFP) e Gonadotrofina Coriônica Humana subunidade β (β -hCG). Os marcadores CA-15.3, CA-125, CA-19.9 e CEA apresentam alta positividade tanto no soro quanto no fluido intracístico de pacientes com tumores epiteliais malignos (CHERCHI *et al.*, 2002; TAVARES-MURTA *et al.*, 2004). A associação de ultrassonografia e marcadores tumorais pode melhorar a sensibilidade e a especificidade como fator preditivo de malignidade nas neoplasias ovarianas (MURTA *et al.*, 2004). Há uma necessidade importante do desenvolvimento de novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do câncer de ovário, que podem também, idealmente, servir como alvos de novas modalidades terapêuticas (ATHANASSIADOU *et al.*, 2008).

1.10 IMUNOLOGIA TUMORAL, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-ALFA) E SEUS RECEPTORES

Proteínas expressas pelo sistema imunológico, as citocinas são 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 (PRIES & WOLLENBERG 2006).

A inflamação crônica é associada a várias etapas da tumorigênese, incluindo a transformação, proliferação e invasão celular, angiogênese e metástase (AGGARWAL et al., 2006; SAMSAMI et al., 2009). 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 (STEIN & DALGLEISH 1994; PRIES & WOLLENBERG 2006).

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

A citocina pró-inflamatória TNF- α está alterada em tumores malignos de ovário em comparação com o epitélio normal da superfície ovariana. Vários estudos têm associado à inflamação com a tumorigênese ovariana, indicando que o TNF- α desempenha um papel chave na modulação da invasão, angiogênese e metástase tumoral (SZLOSAREK et al., 2007; SETHI et al., 2008). A atividade biológica do TNF- α pode ser modulada pelos seus receptores de superfície de membrana, os TNF-R. Estas proteínas são expressas na superfície da membrana e tem grande capacidade de se ligar ao TNF (BALKWILL, 2006; BERTAZZA et al., 2008). A regulação dos TNF-Rs é um fator crítico para se verificar a capacidade de resposta das células tumorais ao TNF- α .

Os níveis de TNF- α no tecido tumoral podem ser mais relevantes comparados com os seus níveis séricos (DOBRZYCKA et al., 2009). Os TNF-R apresentam também uma forma

solúvel, os sTNF-R, e estas formas são antagonistas de citocinas específicas. Elas se ligam no TNF- α circulante e inibem a sua atividade biológica, impedindo a sua ligação aos receptores celulares. Altas concentrações de TNF-R solúvel pode inibir a atividade do TNF e podem, assim, representar um mecanismo de escape do tumor contra os efeitos destrutivos de TNF- α . Embora o papel patogênico real dos sTNF-Rs permaneça controverso, eles têm sido propostos como marcadores fidedignos de local de produção de TNF- α (ANDERSON et al., 2004; SZLOSAREK et al., 2006).

Alguns estudos têm associado à detecção de níveis anormais e elevados de TNF- α no sangue de paciente com câncer do ovário e pacientes com uma ampla variedade de tipos de tumor (GADDUCCI et al., 1995; RADKE et al., 1996). Outros estudos também têm demonstrado que o TNF- α exerce importante papel na promoção do crescimento tumoral e na progressão de neoplasias malignas de ovário (DOBRZYCKA et al., 2009; CHARLES et al., 2009; HASSAN et al., 2009). NOWAK et al. 2010 encontraram produção aumentada de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico em pacientes com câncer de ovário comparada com casos não malignos. Também observaram que a produção de altos níveis de IL-10 e TGF- β 1 pelas células malignas de ovário diminui a produção de Interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α , suprimindo a resposta imune contra as células tumorais. No entanto, o TNF- α circulante nem sempre é detectável em pacientes com câncer e as suas concentrações podem variar de indivíduo para indivíduo durante o tempo e o curso da doença (SZLOSAREK et al., 2006; DARAI et al., 2003).

Um aumento significativo de TNF, sTNF-R1 e sTNF-R2 foi encontrado em soro de mulheres com tumor de ovário comparados ao controle (MIELCZAREK-PALACZ et al., 2012). Em linfomas não-Hodgkin, altos níveis séricos de sTNF-R2 podem predizer um pior prognóstico, sendo um útil biomarcador para selecionar o tratamento mais apropriado (GOTO et al, 2006). Há uma ligação potencial entre tratamentos de artrite reumatoide e psoríase com

agentes anti-TNF- α , como o adalimumab, e o potencial para aparecimento de malignidades, como o melanoma (KOUKLAKIS et al., 2013).

Portanto, o estudo do TNF- α e de seus receptores em neoplasias de ovário pode representar um alvo potencial para investigação de novos fatores diagnósticos, prognósticos e terapêuticos para o câncer de ovário.

2 HIPÓTESE

Níveis elevados de TNF-alfa e seus receptores são encontrados em soro e líquido intracístico em neoplasias malignas de ovário. Elevados níveis séricos e intracísticos de TNFR2 estão relacionados a fatores de mau prognóstico em câncer de ovário.

3 OBJETIVOS

1. Comparar a dosagem de TNF- α e de seus receptores solúveis: receptor tipo 1 (sTNF-1R1) e receptor tipo 2 (sTNF-R2) no soro e no líquido intracístico entre o grupo de neoplasias benignas e o grupo de neoplasias malignas primárias de ovário.
2. Comparar a dosagem de TNF- α e de seus receptores solúveis sTNF-1R1 e sTNF-R2 no soro e no líquido intracístico de pacientes com neoplasia maligna de ovário com fatores prognósticos clínicos, laboratoriais (marcadores tumorais) e patológicos (estadiamento e grau de diferenciação).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo, apresentam-se os materiais utilizados e os métodos realizados no desenvolvimento desse estudo.

4.1 PACIENTES

O estudo foi realizado na Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), Disciplina de Patologia Especial e Disciplina de Farmacologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Foram avaliadas as pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia / Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, submetidas a tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos. Foram selecionados n total de 62 pacientes respeitando os critérios estabelecidos descritos no próximo item.

4.1.1 *Critérios de indicação de laparotomia exploradora*

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

4.1.2 *Caracterização dos grupos*

As pacientes foram divididas em dois grupos, de acordo com o diagnóstico anatomopatológico, desta forma: o primeiro grupo de neoplasias ovarianas epiteliais benignas (n=46), e o segundo grupo de neoplasias ovarianas epiteliais malignas primárias (n=17). Os casos *borderline* foram incluídos no grupo de neoplasias malignas.

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

4.1.3 *Crítérios de inclusão*

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

4.1.4 *Crítérios de exclusão*

Os critérios de exclusão foram: neoplasia maligna secundária de ovário (metástase); tratamento prévio à cirurgia (Quimioterapia), torção do pedículo ovariano, rotura do ovário e recidiva.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 *Análise dos dados*

A análise dos dados foi realizada através da anotação dos seguintes dados: idade, paridade, raça, tabagismo, história de terapia hormonal, contracepção, *status* hormonal, tipo histológico, grau histológico, estadiamento (FIGO), tipo histológico.

4.2.2 *Estudo anátomo-patológico*

O estudo anátomo patológico foi realizado pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do HC - UFTM, nos cortes embebidos em parafina, sendo que os casos serão revisados por um observador da disciplina de Patologia Especial. A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* – FIGO 2014.

Foram considerados tumores ovarianos do tipo I os tumores *borderline* serosos, carcinomas serosos de baixo grau, e carcinomas mucinosos, endometrioides e de células claras. Foram considerados tumores do tipo II os carcinomas serosos de alto grau, tumores mesodérmicos malignos mistos (carcinossarcomas) e indiferenciados (Kurman, Shih, 2010; ALI-FEHMI et al., 2011; KURMAN, SHIH, 2011).

4.2.3 *Coleta do líquido intracístico*

Todos os tumores ovarianos das pacientes submetidas a laparotomia exploradora com massa ovariana cística, ou sólida com áreas císticas, foram submetidos à punção, imediatamente após a exérese do cisto, para a obtenção de 20ml do conteúdo intracístico para a avaliação do microambiente tumoral. Foram utilizadas seringas de 20ml e agulhas 18G x 11,2; 1,2 x 40, estéreis e o líquido coletado por aspiração lenta. Os líquidos peritoneal e intracístico foram

colocados em frascos estéreis, em caixa de isopor com gelo para o transporte até o laboratório da Disciplina de Farmacologia. O lavado peritoneal e o líquido intracístico ovariano foram a seguir centrifugados (1500 rpm, 10 min) e o sobrenadante coletado foi estocado (- 20°C) até o experimento para a dosagem de TNF- α e de seus receptores solúveis: receptor tipo 1 (sTNF-1R1) e receptor tipo 2 (sTNF-R2)

4.2.4 Dosagem de TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2 no plasma

Os níveis de TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2 no plasma foram determinados por método imunoenzimático (ELISA). As concentrações foram calculadas através de comparação com curvas-padrão das mesmas. Os resultados foram expressos em pg/ml. A coleta do soro foi realizada no pré-operatório.

4.2.5 Análise imuno-enzimática

Amostras de sangue venoso foram coletadas através do sistema à vácuo em tubos com gel separador (*BD Vacutainer*[®]). Após 30 minutos de coagulação as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos à 2000rpm, onde o soro foi armazenado em alíquotas de 250 μ L à -20°C até sua utilização.

As amostras foram descongeladas uma vez imediatamente antes da análise. Os níveis séricos de TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2 foram medidos utilizando o kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) imuno-enzimático tipo sanduíche (*Aviscera Bioscience*[®] Inc.) onde todos os reagentes foram preparados conforme protocolo do fabricante. Para a realização do teste, em resumo, foram adicionados aos poços da placa de ELISA, revestida com anticorpo monoclonal contra TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2, 100 μ L de tampão de diluição, padrões diluídos, amostras e controle positivo correspondendo respectivamente aos poços branco, curva, amostras e controle positivo.

A placa de ELISA foi coberta por selante adesivo e incubada 2h. em temperatura ambiente em micro agitador de placas. Em seguida foi realizada aspiração e lavagem dos poços 3 vezes com 300 μ L de tampão de lavagem utilizando-se pipetas multi-canal automáticas. Foi retirado totalmente o excesso de líquidos dos poços adicionando-se em seguida. 100 μ L do anticorpo de detecção biotilado contra TNF- α , sTNF-1R1 e sTNF-R2 onde uma segunda incubação foi realizada por 2h. em temperatura ambiente em micro agitador de placas. Foi repetida a aspiração e lavagem como descrito acima e após foi adicionado 100 μ L do conjugado de estreptavidina com peroxidase (HRP) e uma terceira incubação foi realizada por 1h. em temperatura ambiente em micro agitador de placas completamente protegida da luz. Foram realizadas as lavagens e em seguida foi adicionado 100 μ L em cada poço da solução substrato de tetrametilbenzidina (TMB) incubando a placa por 5min. em temperatura ambiente completamente protegida da luz. Após a incubação foram adicionados em cada poço 100 μ L da solução de parada (0,5M de HCl). Finalmente, a densidade óptica de cada poço foi determinada utilizando um leitor de microplacas fixado para 450nm. O teste possui um limite de detecção de 1pg/mL, precisão inter-ensaio de 8-10% e precisão intra-ensaio de 4-6%.

4.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *GraphPad Prism software*. Os resultados foram expressos em medianas e percentis. Os resultados entre os grupos não pareados (neoplasias benignas e malignas) foram comparados através do teste Mann-Whitney.

4.2.7 Redação do texto

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

5 RESULTADOS

As 63 pacientes atendidas foram divididas em dois grupos, sendo o de neoplasias benignas constituídos de 46 pacientes e o de neoplasias malignas constituído de 17 pacientes. A mediana da idade entre esses dois grupos foi respectivamente 48 (31-74) anos e 50 (32-79) anos. A mediana do número de gestações e da paridade no grupo das neoplasias benignas foi de 2 (0-16) gestações e 2 (0-13) partos; enquanto a mediana do número de gestações e da paridade no grupo das neoplasias malignas foi de 2 (0-7) gestações e 2 (0-6) partos.

54,2% (19 pacientes) das mulheres no grupo das neoplasias benignas eram menopausadas e a mediana da menopausa nessas mulheres foi de 49 (32-55) anos, enquanto a menarca dessas pacientes teve mediana de 13 (10-16) anos. Já no grupo das neoplasias malignas 64,7% (11 pacientes) eram menopausadas e a mediana da menopausa e da menarca nesse grupo foi de 49 (32-60) anos e 13 (9-15) anos. Entre as menopausadas, 2 (10,5%) faziam terapia hormonal durante o estudo no grupo de neoplasias benignas e nenhuma (0%) fazia terapia hormonal no grupo das neoplasias malignas

A porcentagem de óbitos no grupo das neoplasias malignas foi de 41,1% (7 pacientes) enquanto no grupo de doenças benignas foi de 0% (nenhuma paciente).

Entre as pacientes do grupo de neoplasias benignas, 34 (75,5%) pacientes eram casadas, 12 (26,6%) pacientes eram solteiras e 2 (4,4%) pacientes eram viúvas; sendo que 20 (44,4%) pacientes utilizavam como método contraceptivo a laqueadura tubária, 9 (20%) pacientes utilizavam contraceptivos hormonais, 17 (37,7%) utilizavam nenhum método contraceptivo e 2 (4,4%) pacientes utilizava-se de CONDOM. Já no grupo das neoplasias malignas, 10 eram casadas, 5 eram solteiras e 2 eram viúvas perfazendo percentuais de 58,8/ 29,4/ 11,8% respectivamente; já seus métodos contraceptivos eram em 88,2% (15 pacientes) nenhum método e 11,8% (2 pacientes) laqueadura tubária. O descrito acima está representado na Tab.3

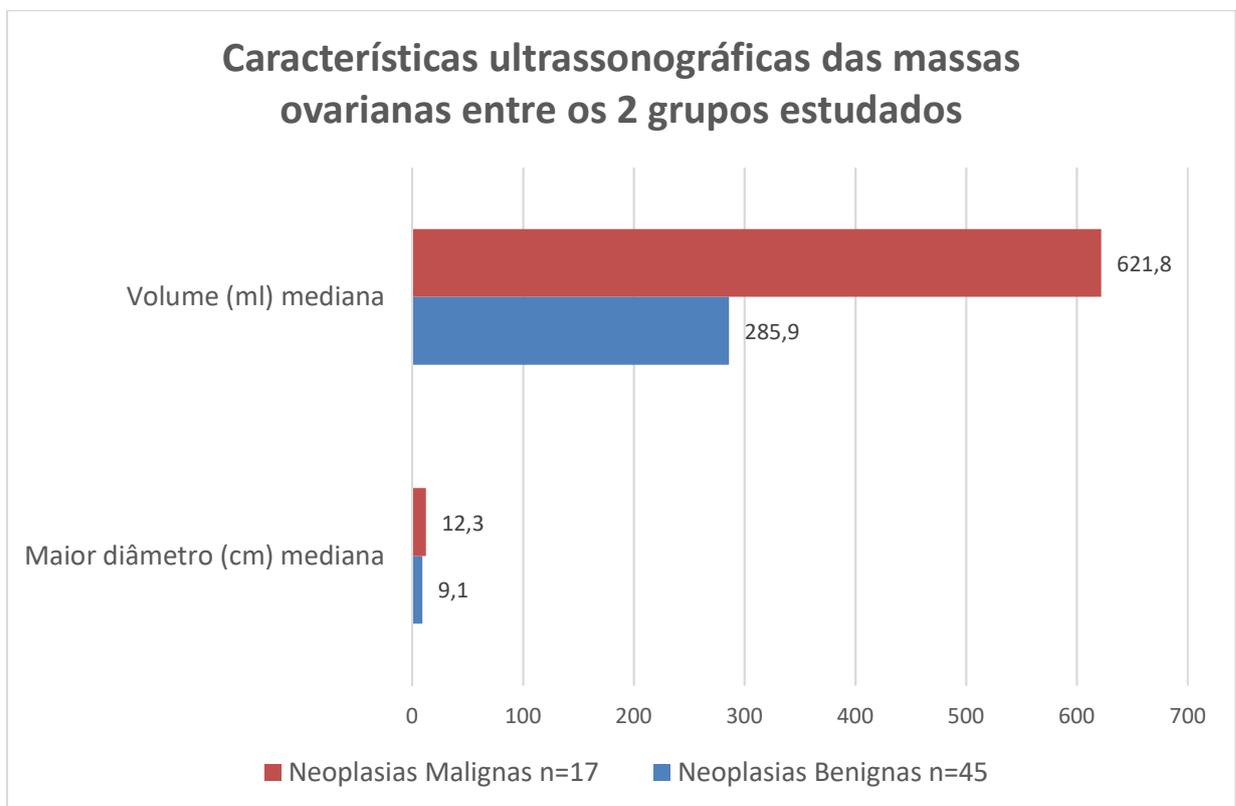
Tabela 3 - Características dos dois grupos de pacientes comparados no estudo.

	Neoplasias benignas		Neoplasias malignas	
	n=45	%	n=17	%
Idade (mediana em anos)	48	**	50	**
Gestações (mediana)	2	**	2	**
Paridade (mediana)	2	**	2	**
Idade do Menacme (mediana)	13	**	13	**
Idade da Menopausa (mediana)	49	**	49	**
Menopausa	19	54,2	11	64,7
Uso de TH	0	0	2	14,5
Estado Civil				
Casada	34	75,5	10	58,8
Solteira	12	26,6	5	29,4
Viúva	2	4,4	2	11,8
Método Contraceptivo				
Laqueadura Tubária	20	44,4	2	11,8
Contraceptivo Hormonal	9	20	0	0
CONDOM	2	4,4	0	0
Nenhum	14	31,1	15	88,2
Óbito	0	0	7	41,1

Fonte: O autor

O estudo da massa ovariana avaliada pelo US transvaginal teve como mediana do seu volume de 273,8 (4,8-8400,0) ml e a mediana do maior diâmetro foi de 8,8 (2,6- 34,1) cm no grupo de neoplasias benignas e 655 (96,2-4255,0) ml e 12,5 (8-22,5) cm no grupo das neoplasias malignas. (Fig. 1)

Fig1- Características ultrassonográficas das massas ovarianas entre o grupo de neoplasias ovarianas benignas e o grupo de neoplasias ovarianas malignas



Fonte: O autor

Entre as neoplasias benignas, 24 (52,17%) tiveram como diagnóstico histológico o cistoadenoma seroso, 20 (43,48%) cistoadenomas mucinosos, 1 (2,17%) cistoadenoma seroso associado à tumor de Brenner, 1 (2,17%) cistoadenomamucinoso associado à tumor de Brenner. Entre as neoplasias malignas e *borderline*, 5 (29,41%) tiveram como diagnóstico histológico o tumor mucinosoboderline, 2 (11,76%) tumores serosos *boderline*, 5 (29,41%)

cistoadenocarcinomas serosos, 2 (11,76%) carcinomas de células claras, 1 (5,88%) adenocarcinoma endometrióide (5,88%), 1 adenocarcinoma de grandes células e 1 (5,88%) neoplasia maligna de alto grau.

Tabela 4 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia benigna

	Neoplasias benignas	
	n=45	%
Cistoadenoma serosos	21	46,66
Cistoadenoma mucinoso	21	46,66
Struma ovarii	1	2,22
Tu mucinoso primitivo do ovário	1	2,22
Cistos simples do ovário	2	4,44

Fonte: O autor

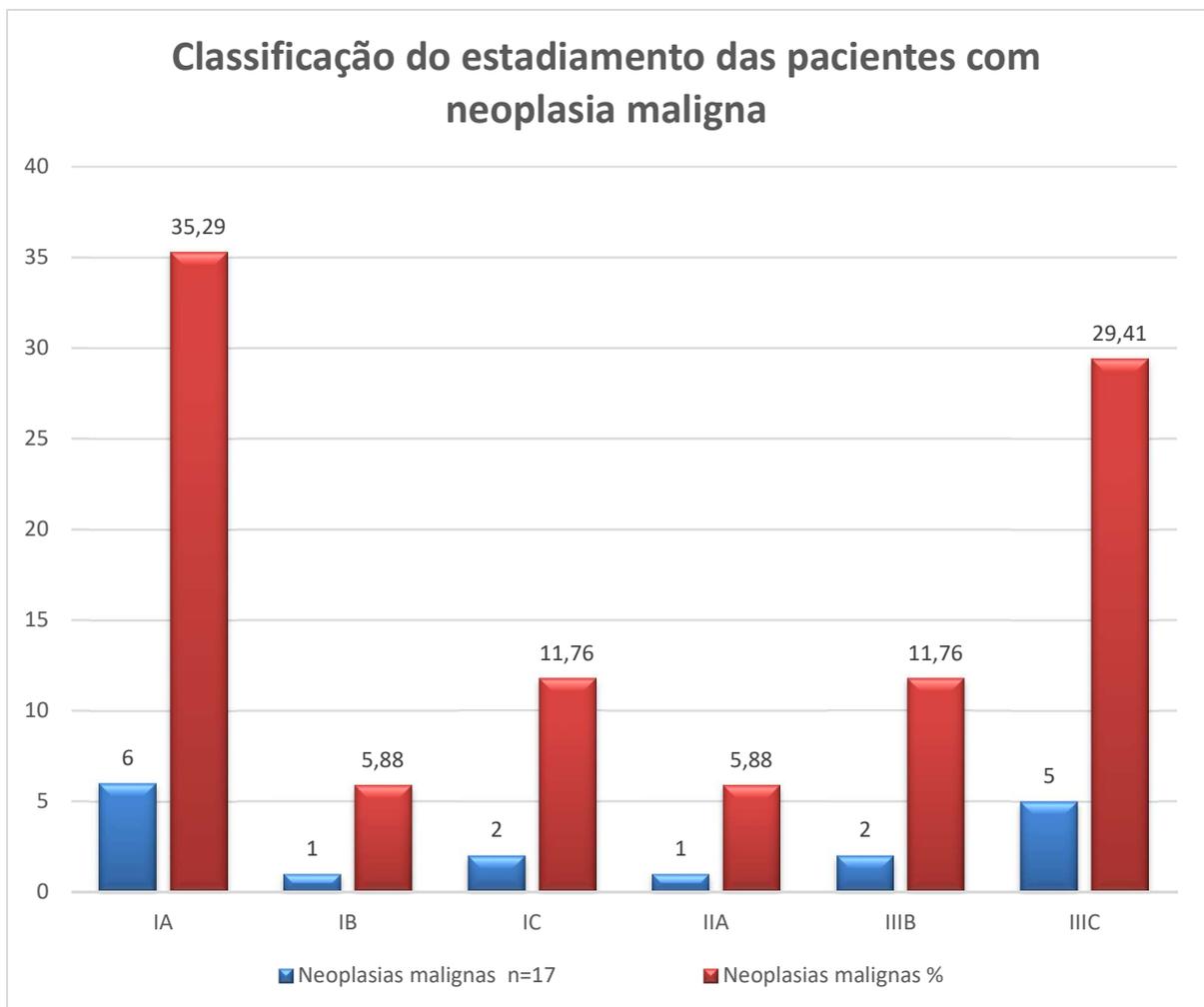
Tabela 5 - Classificação histológica dos tumores das pacientes com neoplasia maligna

	Neoplasias benignas	
	n=17	%
Tumor mucinoso <i>boderline</i>	5	29,41
Tumor seroso <i>boderline</i>	3	17,64
Cistoadenocarcinoma serosos	5	29,41
Carcinomas de células claras	2	11,76
Adenocarcinoma endometrióide	1	5,88
Neoplasia maligna moderadamente diferenciada de alto grau.	1	5,88

Fonte: O autor

O estadiamento das pacientes com tumores malignos também foi muito variável sendo: 6 diagnósticos no estadiamento IA, 1 paciente no estadiamento IB, 2 pacientes no estadiamento IC, 1 paciente no estadiamento IIA, e o restante das pacientes em estadiamento III sendo, 2 no IIIB e 5 no IIIC (Fig 4), sendo que 11 foram submetidos à esquema de quimioterapia como forma complementar de tratamento e 6 não foram (Estadiamento IA) (Fig 2).

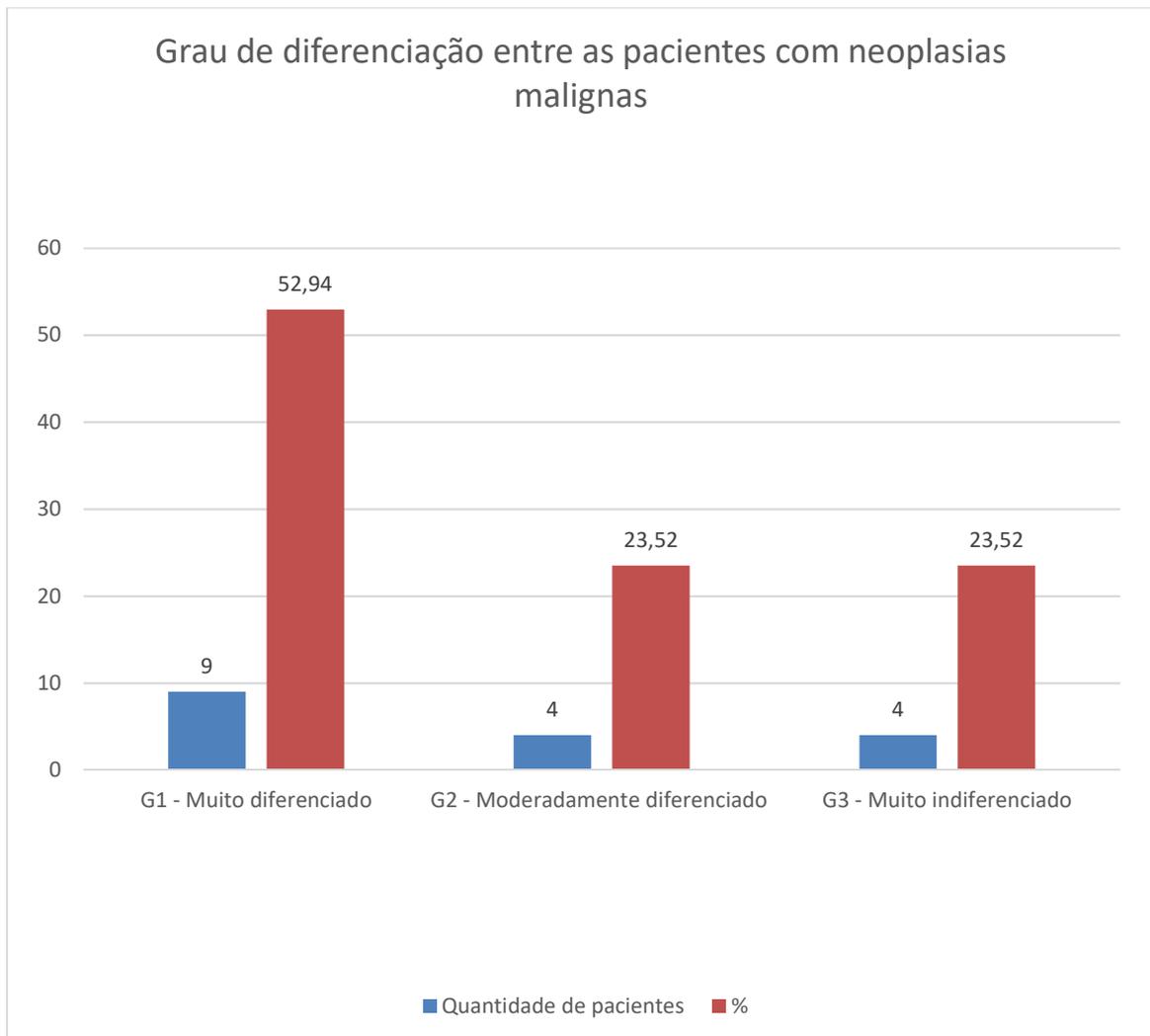
Fig 2- Classificação do estadiamento das pacientes com neoplasia maligna segundo a FIGO 2014



Fonte: O autor

Entre as pacientes com neoplasias malignas, 9 (52,94 %) eram grau histológico G1 (muito diferenciado), 4 (23,52 %) eram G2 (moderadamente diferenciado) e 4 (23,52 %) eram G3 (muito indiferenciado) (Fig. 3).

Fig 3- Grau de diferenciação entre as pacientes com neoplasias malignas

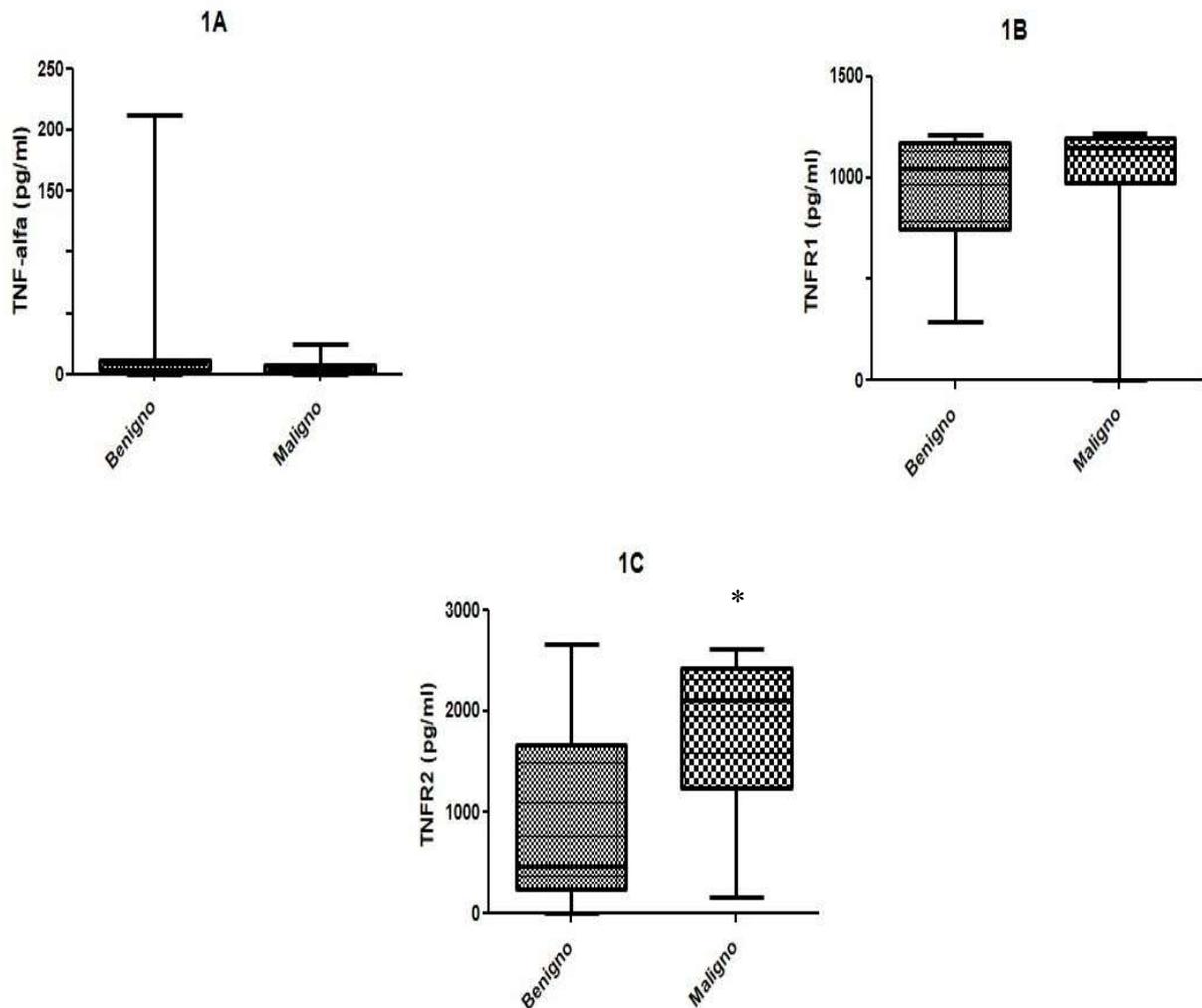


Fonte: O autor

A mediana no líquido intracístico do TNF-alfa, TNF-R1, TNF-R2 medido em pg/ml foram respectivamente de 9,5; 1047,0; 479,6 no grupo das neoplasias benignas e 4,6 ; 1142,3 e 2098,5 no grupo das neoplasias malignas, sendo que a dosagem de TNF-R2 intracístico foi significativamente mais alta nas neoplasias malignas quando comparado com as neoplasias

benignas ($p=0.0235$). O percentil 25 e o percentil 75 no líquido intracístico do TNF-alfa , TNF-R1 , TNF-R2 medido em pg/ml foram respectivamente de (3,7 -12,0); (743,9 – 1170,0); (231,7 – 1665,0) para as neoplasias benignas e de (1,4 – 8,4); (971,3 – 1192,0); (1239,0 – 2419,0) para as neoplasias malignas. (Fig 4)

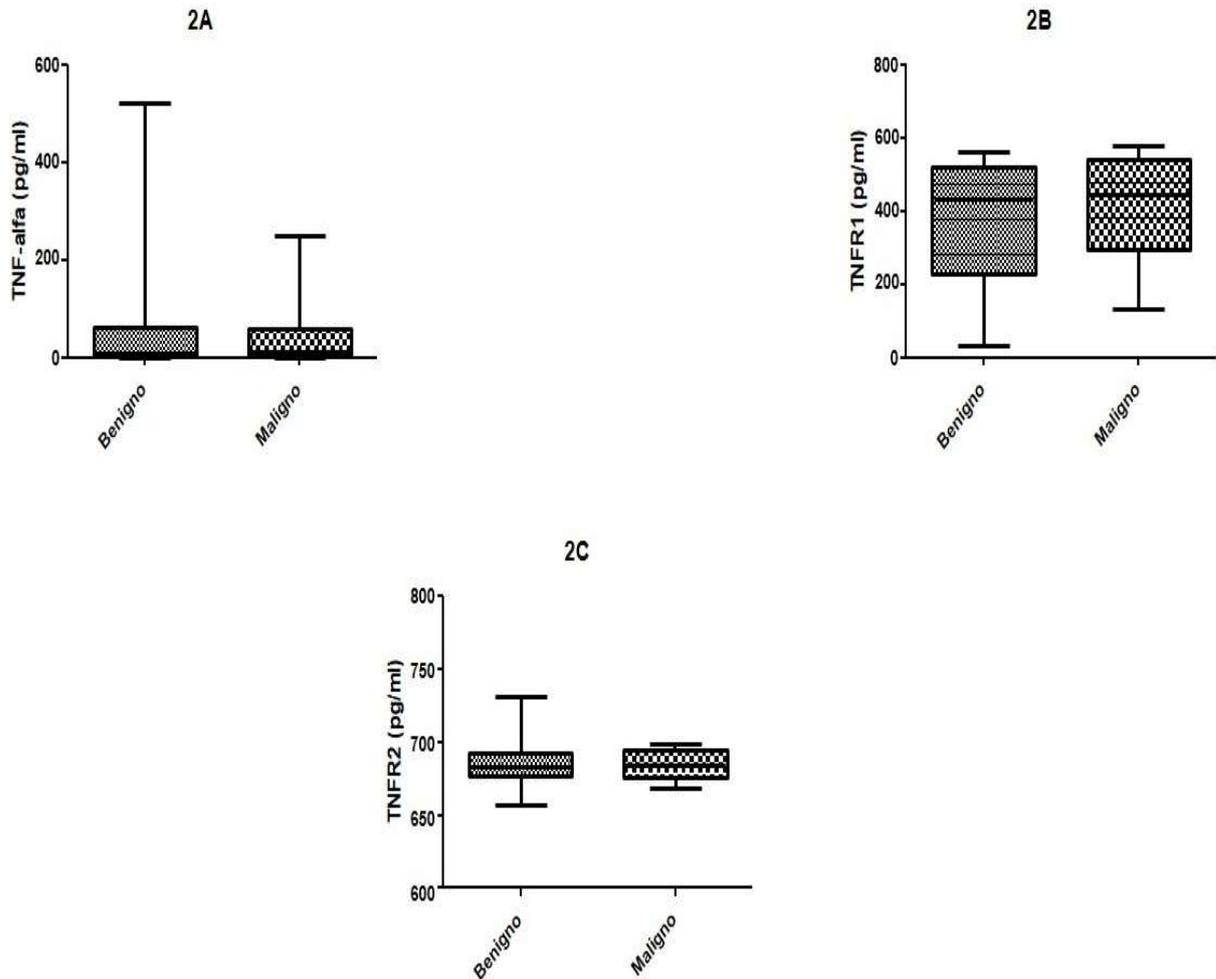
Fig 4: Níveis de TNF-alfa (pg/ml) e seus receptores TNF-R1 e TNF-R2 no líquido intra-cístico de pacientes com neoplasias benignas e malignas de ovário. * $p=0.0235$ versus neoplasias benignas (Mann-Whitney).



Fonte: O autor

Já a mediana dos níveis de TNF-alfa no soro pré-cirurgia foi de 10,4 no grupo das neoplasias benignas e 12,0 no grupo de neoplasias malignas. Já a mediana do TNF-R1 e TNF-R2 no soro pré-cirurgia foi respectivamente de 435,3 e 683,5 no grupo de neoplasias benignas e ainda 447,5 e 684,4 no grupo de neoplasias malignas, sem valores estatisticamente significativos. Os percentis 25 e 75 do TNF alfa no soro pré-cirurgia foi de (4,52 – 63,93) no grupo de neoplasias benignas e (2,5 – 60,85) no grupo de neoplasias malignas. Já os percentis 25 e 75 do TNF-R1 e TNF-R2 no soro pré-cirurgia foram respectivamente de (230,4 – 521,0) e (677,3 – 692,0) no grupo de neoplasias benignas e ainda (294,9 – 540,8) e (675,9-694,4) no grupo de neoplasias malignas (Fig. 5). Os níveis de TNF-alfa, TNF-R1 E TNF-R2 foram medidos em pg/ml.

Fig 5: Níveis de TNF-alfa (pg/ml) e seus receptores TNF-R1 e TNF-R2 no soro pré-operatório de pacientes com neoplasias benignas e malignas de ovário.

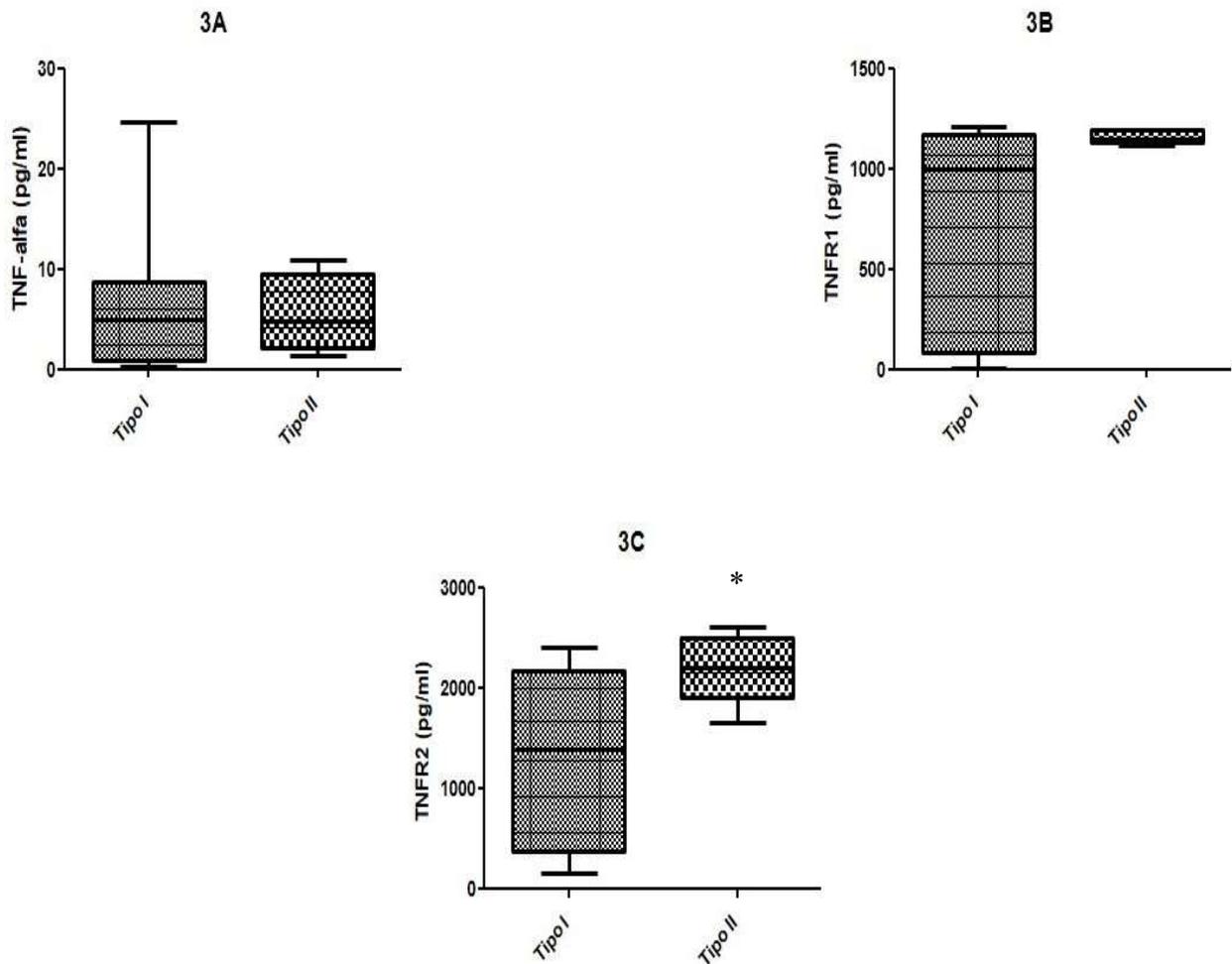


Fonte: O autor

A mediana e os percentis (25 e 75) dos níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intracístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas e comparando-as aos tipos I e II foram respectivamente de 5,0 (0,9-8,7); 1001,0 (87,1-1172,0); 1397,0 (381,1 – 2179,0), nas neoplasias malignas classificadas no tipo I e de 4,3 (1,4-8,1); 1148,0 (1131,0-1194,0); 2211,0 (1919,0-2515,0) nas neoplasias malignas do

tipo II. Verificamos que valores maiores do TNF-R2* foram mais elevados nas pacientes com câncer tipo II, porém com valor de $p = 0,08$. (Fig. 6)

Fig 6- Os níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intra-cístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas comparando aos tipos I e II, * $p = 0,08$ versus tipo I (Mann-Whitney).



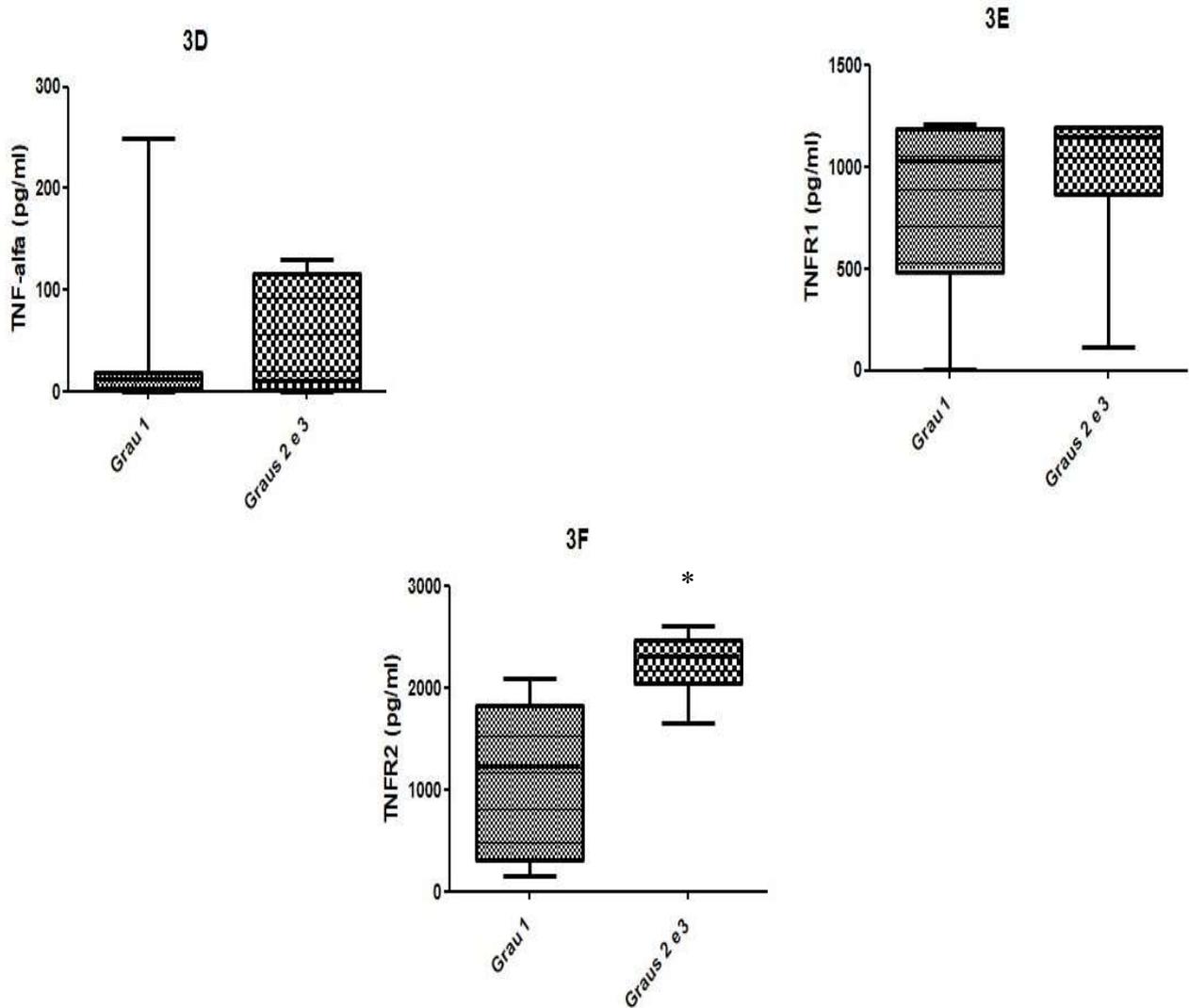
Fonte: O autor

A mediana e os percentis (25 e 75) dos níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intracístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas e comparando-as ao graus de diferenciação tumoral, foram respectivamente 7,1 (0,75 – 10,25); 1031,0 (487,1 – 1186,0); 1239,0 (305,8- 1827,0) em pacientes com grau 1 de diferenciação tumoral e de 4,3 (1,4-5,3); 1146,0 (868,9- 1193,0); 2315,0 (2048,0 – 2468,0) em pacientes com grau de diferenciação 2/3. Verificamos que valores maiores do TNF-R2 foram encontrados nas pacientes com câncer com graus de diferenciação 2 e 3; $p = 0,0087$. (Fig. 7)

A mediana e os percentis (25 e 75) dos níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intracístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas e comparando-as ao estadiamento tumoral, foram respectivamente 1,4 (1,15 – 7,4); 1095,0 (729,2 – 1193,0); 1668,0 (381,1 – 2285,0) em pacientes com estadiamento I/II e de 5,3 (4,3 – 10,9); 1143,0 (617,7 – 1181,0); 2211,0 (1608,0 – 2420,0) em pacientes com estadiamento III ou IV. Verificamos que não houve diferença estatística significativa. (Fig. 8)

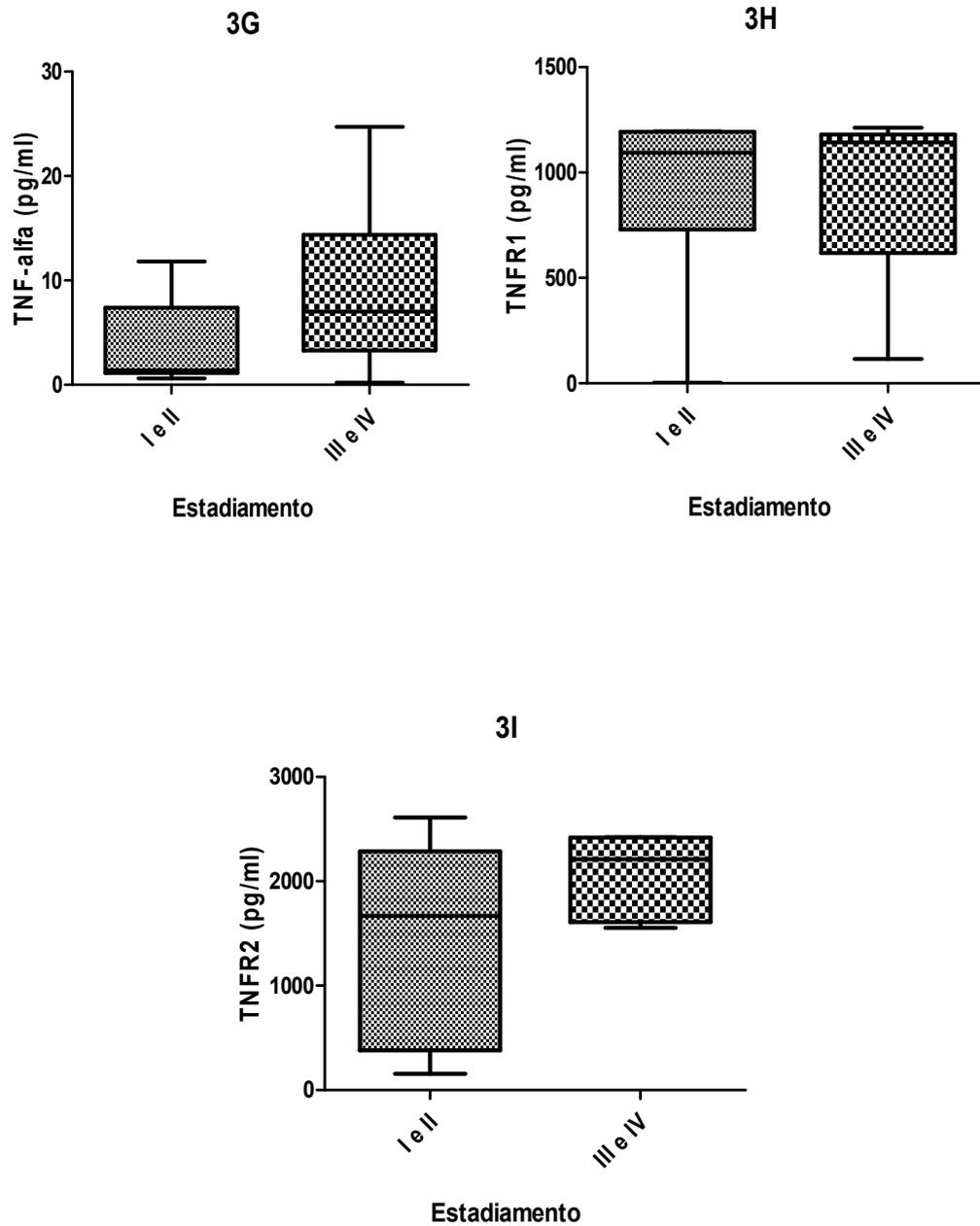
A mediana e os percentis (25 e 75) dos níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatório e comparando-as aos tipos I e II de acordo com a classificação de SHIHS 2010, foram respectivamente 12,25 (2,32 – 22,4); 515,8 (297,9 – 546,1); 683,9 (677,8 – 694,3) nas neoplasias malignas classificadas no tipo I e 9,7 (1,7 – 113,3); 343,8 (291,8 – 413,4); 684,4(669,5- 696,6) nas neoplasias classificadas como tipo II. Dosando os níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatórios obtidas de pacientes com neoplasias malignas e comparando-as aos tipos I e II, verificamos que não houve diferença estatística entre os grupos. (Fig. 9)

Fig 7- Níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de líquido intra-cístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas comparando com o grau histológico; * p = 0,0087 vs. grau 1 (Mann-Whitney).



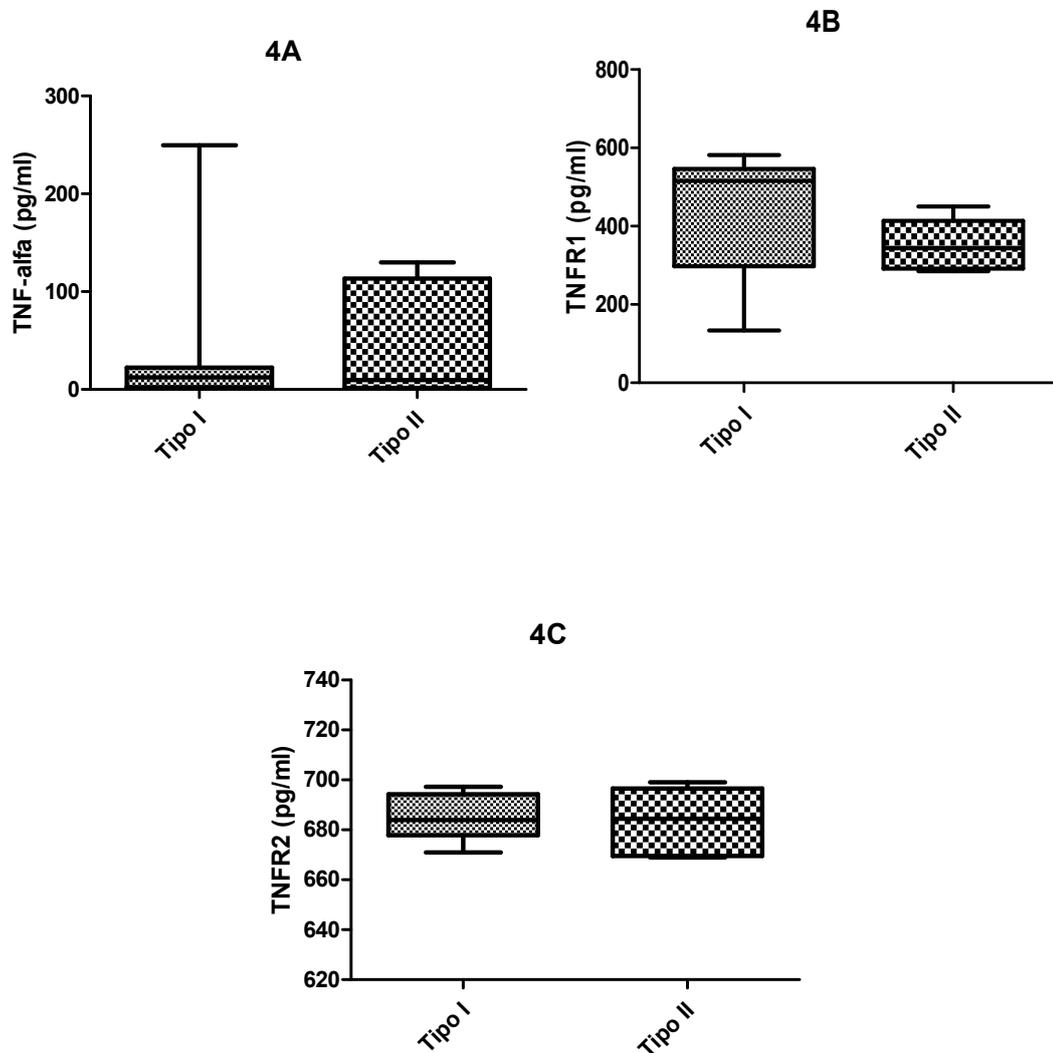
Fonte: O autor

Fig 8- Níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de fluido intracístico obtidas de pacientes com neoplasias malignas comparando-as ao estadiamento tumoral - FIGO (Mann-Whitney).



Fonte: O autor

Fig 9- Níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatórias obtidas de pacientes com neoplasias malignas comparando-as aos tipos I e II (Mann-Whitney)



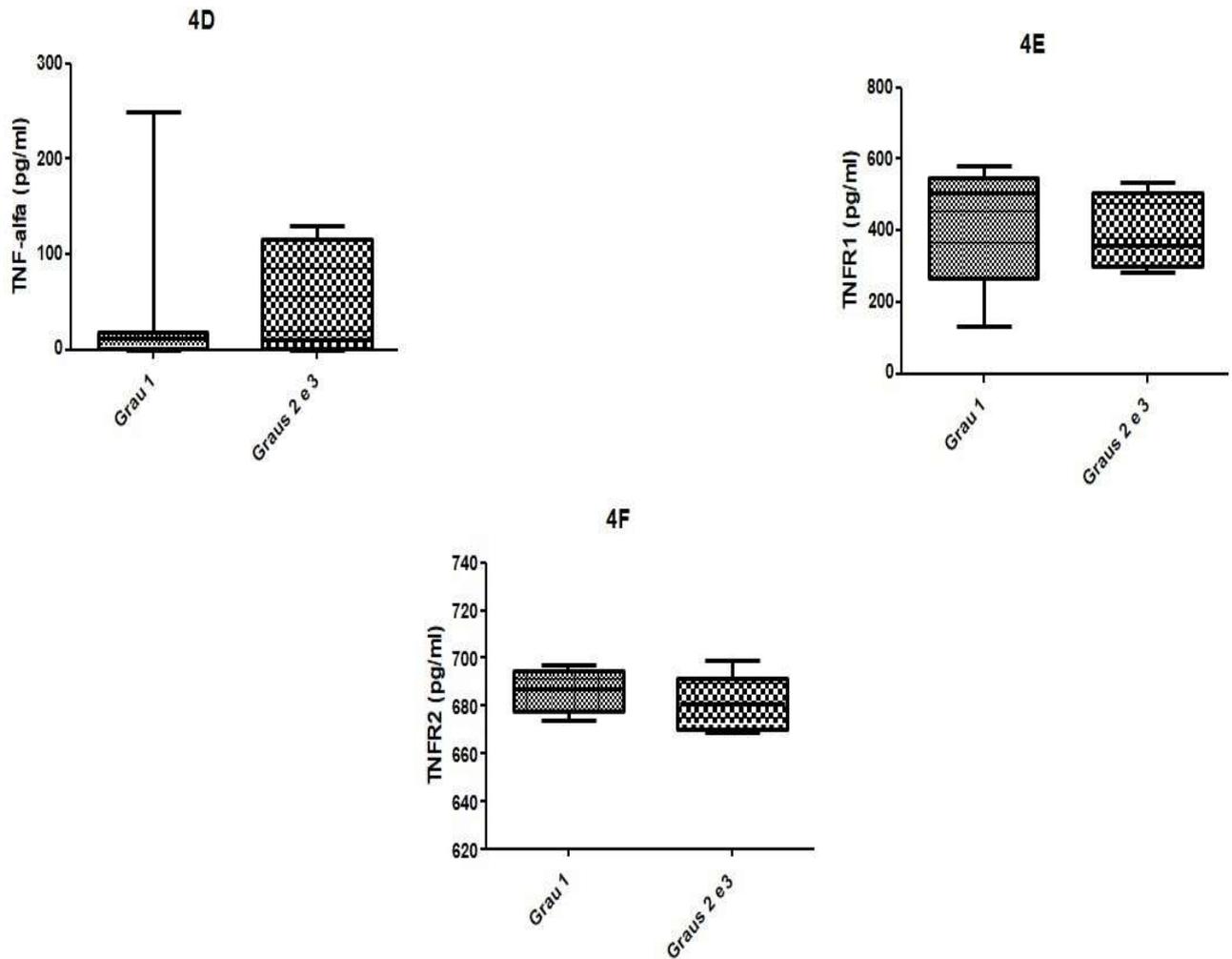
Fonte: O autor

A mediana e os percentis (25 e 75) dos níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatório e comparando-as ao grau de diferenciação tumoral, foram respectivamente 12,0 (2,55-19,7); 506,3 (269,9 – 549,6); 687,3 (678,1 -694,8) nas pacientes com neoplasias grau 1 de diferenciação e de 11,1 (1,8 – 115,5); 360,2 (303,3 – 506, 5); 680,7 (670,3 – 691,7) nas pacientes com neoplasia maligna com grau

de diferenciação 2/3. Verificando os níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatório obtidas de pacientes com neoplasias malignas e comparando-as aos graus de diferenciação tumoral, que não houve diferença estatística significativa. (Fig.10).

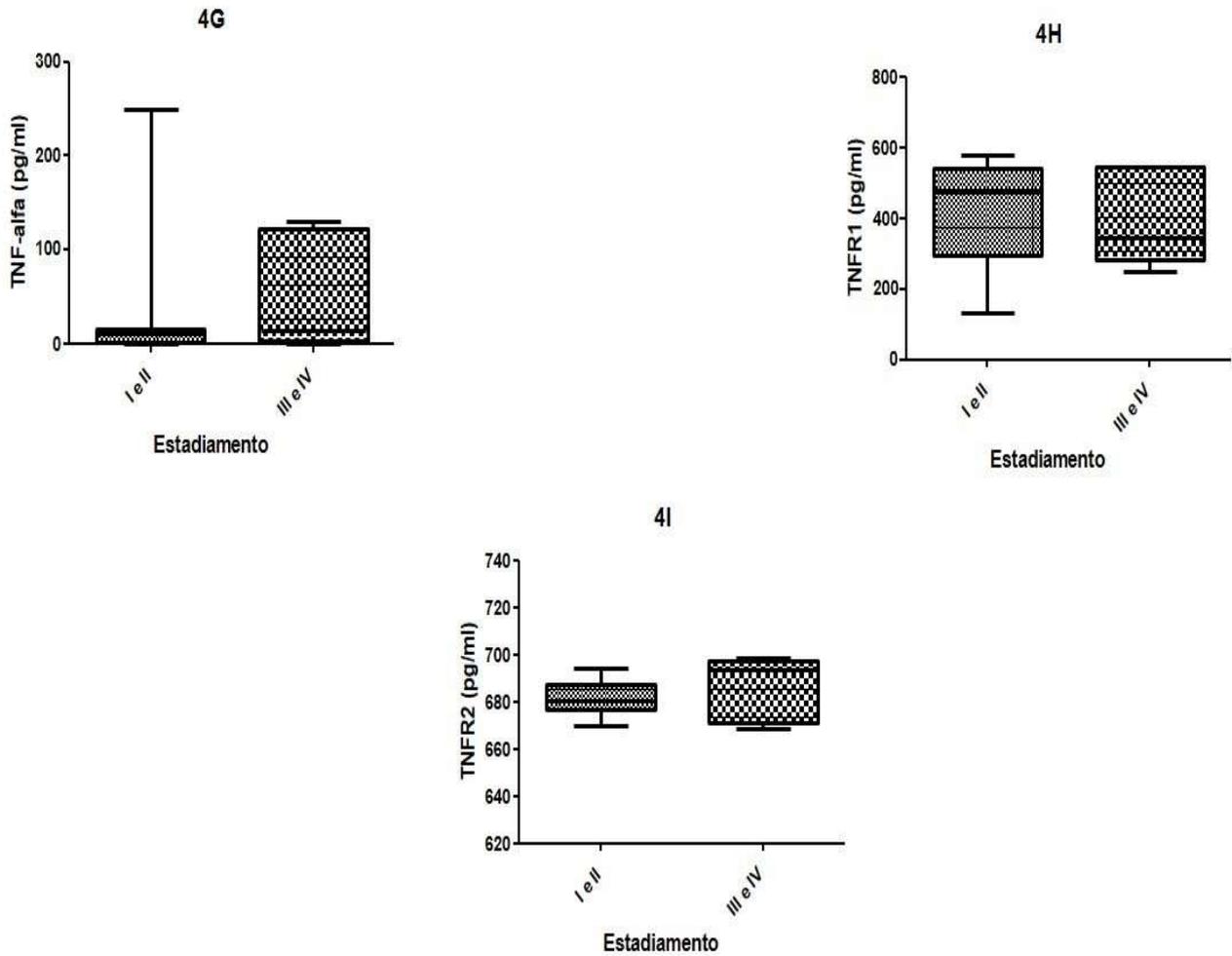
A mediana e os percentis (25 e 75) dos níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatório e comparando-as ao estadiamento tumoral, foram respectivamente de 10,55 (1,92-15,65); 478,2 (296,7 – 540,2); 680,7 (676,8 – 687,6) nas pacientes com neoplasias malignas com estadiamento I ou II e de 14,3 (3,0-121,8); 343,8 (285,0 – 545,6); 694,1 (670,9 – 697,3) nas pacientes com neoplasias malignas com estadiamento III ou IV. Em relação ao estadiamento tumoral ao comparar os níveis de TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2 (pg/ml) determinados a partir de soro pré operatório, obtidas de pacientes com neoplasias malignas, verificamos que não houve diferença estatística significativa. (Fig 11).

Fig.10- Níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré-operatório obtidas de pacientes com neoplasias malignas comparando-as ao grau histológico (Mann-Whitney).



Fonte: O autor

Fig.11- Os níveis de TNF-alfa, TNF-R1 e TNF-R2 (pg / ml) determinados a partir de amostras de soro pré operatório obtidas de pacientes com neoplasias malignas comparando-as ao estadiamento tumoral - FIGO (Mann-Whitney).



Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

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

A mediana de idade das nossas pacientes foi de 47 anos para o grupo de neoplasias benignas e 50 anos para o grupo de neoplasias malignas, a paridade mediana para ambos os grupos foi de 2 partos. Valores similares foram encontrados na literatura (STAFF *et al.*, 2010).

A resposta imunológica e a ocorrência de neoplasias tem sido amplamente documentada (KNUTSON *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; BAERT *et al.*, 2015; COOSEMANS *et al.*, 2015). O sistema imune possui propriedades distintas no câncer epitelial de ovário, onde há atuação de células efectoras e imunomoduladoras (BAERT *et al.*, 2015). O microambiente tumoral limita a atuação das células que combatem a proliferação e deslocamento das células neoplásicas a outros tecidos e favorece a diferenciação de células que regulam o sistema imune para um perfil imunossupressor, ocasionando o aumento das massas tumorais, bem como a migração das células tumorais à tecido adjacentes, ocasionando a progressão da doença e elevando seu risco de malignização, principalmente em pacientes em estádios mais avançados do câncer (BAERT *et al.*, 2015).

O microambiente tumoral em câncer epitelial de ovário geralmente é inflamatório. Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias podem levar a um ambiente imunossupressor (GIUNTOLI ET AL, 2009; MHAWECH-FAUCEGLIA ET AL., 2013). TNF é uma citocina pleiotrópica produzida durante resposta fisiológica à infecção, injúria ou isquemia por várias células, como linfócitos, células natural-killer, células endoteliais e células de músculo liso (AGGARWAL 1992; TURETSKAYA ET AL., 1992). As atividades do TNF são mediados pela interação com 2 receptores: TNFR1, ou p55, e TNFR2, ou p75, que são expressos em vários tipos celulares (TARTAGLIA&GOEDDEL 1992; ROTHE ET AL., 1992). Cada receptor pode

ser clivado em uma forma solúvel capaz de ligar e neutralizar TNF. A expressão de receptores de TNF é regulada em resposta a isquemia e injúria, fornecendo importante nível de controle biológico das atividades de TNF, e a ativação de cada um dos receptores modulam distintas respostas celulares. O receptor p55 medeia apoptose TNF-induzida (SMITH 1994), mas a função de p75 é mais obscura, podendo estar implicado na proliferação celular, crescimento tumoral e angiogênese (SASI ET AL, 2012).

Quando produzido cronicamente no microambiente tumoral, o TNF- α age como citocina pró-inflamatória e promotora do tumor (CHARLES et al., 2009). Os níveis de TNF- α no tecido tumoral podem ser mais relevantes comparados com os seus níveis séricos (DOBRZYCKA et al., 2009). Os TNF-R apresentam uma forma solúvel, os sTNF-R, e estas formas são antagonistas de citocinas específicas. Elas se ligam no TNF- α circulante e inibem a sua atividade biológica, impedindo a sua ligação aos receptores celulares. Altas concentrações de TNF-R solúvel pode inibir a atividade do TNF e podem, assim, representar um mecanismo de escape do tumor contra os efeitos destrutivos de TNF- α . Embora o papel patogênico real dos sTNF-Rs permaneça controverso, eles têm sido propostos como marcadores fidedignos de local de produção de TNF- α (ANDERSON et al., 2004; SZLOSAREK et al., 2006).

Vários estudos têm associado a detecção de níveis anormais e elevados de TNF- α no sangue de pacientes com câncer do ovário e pacientes com uma ampla variedade de tipos de tumor (GADDUCCI et al., 1995; RADKE et al., 1996). Estes estudos também têm demonstrado que o TNF- α exerce importante papel na promoção do crescimento tumoral e na progressão de neoplasias malignas de ovário (DOBRZYCKA et al., 2009; CHARLES et al., 2009; HASSAN et al., 2009). NOWAK ET AL. (2010) encontraram produção aumentada de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico em pacientes com câncer de ovário comparada com casos não malignos. Também observaram que a produção de altos níveis de IL-10 e TGF- β 1 pelas células malignas de ovário diminui a produção de Interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α ,

suprimindo a resposta imune contra as células tumorais. No entanto, o TNF- α circulante nem sempre é detectável em pacientes com câncer e as suas concentrações podem variar de indivíduo para indivíduo durante o tempo e o curso da doença (SZLOSAREK et al., 2006; DARAI et al., 2003), o que poderia explicar por que não encontramos diferenças entre os valores de TNF- α entre neoplasias benignas comparado a malignas. Em um recente estudo prospectivo, CLENDENEN et al. (2007) relataram que as mulheres no quartil mais elevado do nível de IL-6 contra as mulheres no quartil mais baixo tiveram um risco aumentado 70% de câncer de ovário; no entanto, não foram observadas associações de TNF- α ou seus receptores solúveis. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de POOLE et al. (2013), onde não houve associação significativa entre a interleucina 6 ou tumor fator de necrose - α receptor 2.

Um aumento significativo de TNF, sTNF-R1 e sTNF-R2 foi encontrado em soro de mulheres com tumor de ovário comparados ao controle (MIELCZAREK-PALACZ et al., 2012), porém não foram detectados em nosso estudo. Em linfomas não-Hodgkin, altos níveis séricos de sTNF-R2 podem predizer um pior prognóstico, sendo um útil biomarcador para selecionar o tratamento mais apropriado (GOTO et al, 2006). Há uma ligação potencial entre tratamentos de artrite reumatoide e psoríase com agentes anti-TNF- α , como o adalimumab, e o potencial para aparecimento de malignidades, como o melanoma (KOUKLAKIS et al., 2013). TNFR2+ Tregs obtidas de ascites associadas a tumores estavam presentes em grande quantidade em pacientes com câncer de ovário (GOVINDARAJ et al., 2013). Em nosso estudo, valores maiores de TNF-R2 intracístico foram encontrados nas neoplasias malignas quando comparado com as neoplasias benignas.

Na avaliação do tecido em câncer de ovário, a expressão de TNF- α pode variar dependendo do tipo histológico (GUPTA et al., 2016), e a expressão de TNF- α e TNFR1 podem variar dependendo do grau de diferenciação (JAMMAL et al., 2016; MARTINS-FILHO et al. 2014). Além disso, a expressão de TNFR1 mRNA foi igual em tecido de câncer ovariano

comparado a tecido ovariano normal (PIURA et al., 2014). Essa variabilidade poderia explicar por que, em nosso estudo, não houve diferença dos fatores prognósticos relacionados ao TNF e TNFR1.

Em pacientes com câncer epitelial de ovário, imunomarcção forte de TNFR1 no estroma peritumoral esteve relacionado a menor sobrevida livre de doença, sugerindo ser um fator de mau prognóstico (JAMMAL et al., 2016). A ação autócrina de TNF- α pelas células neoplásicas gera uma rede de outras citocinas, fatores angiogênicos e quimiocinas que agem de maneira autócrina e parácrina, levando à neovascularização e infiltração do peritônio por células tumorais (KULBE et al., 2007). Níveis altos de TNF-alfa associado a altos níveis de IL6 em ascite de pacientes com câncer de ovário tiveram associação com menor sobrevida livre de progressão após a cirurgia primária (KOLOMEYEVSKAYA et al., 2015). Expressão TNF-R2 in tecido de câncer epitelial de ovário correlacionou com mais alto risco de progressão da doença (DOBRZYCKA et al., 2009 Folia). Nós encontramos valores maiores de TNFR2 intracístico relacionados a câncer de ovário tipo II, com tendência à significância. Além disso, Valores maiores de TNFR2 intracístico estiveram relacionados a graus de diferenciação 2 e 3, sugerindo associação com tumores de pior prognóstico. Em nosso conhecimento, ainda não há nenhum estudo na literatura avaliando os receptores solúveis de TNF no líquido intracístico de tumores de ovário.

Um estudo mostrou que houve correlação de TNFR1 sérico com escore de ultrassonografia morfológica e níveis de CA-125, mas não encontraram relação com estadiamento (FIGO) e grau tumoral (OPALA et al., 2005). Outro estudo demonstrou que a expressão de TNFR2 foi mais alta em câncer de ovário estadiamento IV comparado a estadiamento III (DONG et al., 2008). Nosso estudo não demonstrou relação com estadiamento, talvez pela pequena amostra de pacientes.

Atualmente, os tratamentos baseados em TNF não levam em consideração a possibilidade de inibição seletiva do TNFR2. Estudos recentes têm demonstrado que a inibição seletiva do eixo de sinalização TNF-TNFR2 pode levar ao aumento da apoptose tumoral e à inibição da angiogênese, levando a um novo alvo para o tratamento do câncer (SASI ET AL., 2014). TNFR2 é predominantemente expresso por células T regulatórias (Tregs) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, podendo exercer atividade supressora, levando a um mecanismo de evasão pelo tumor mediado por linfócitos que infiltram tumores (TILs) em modelo tumoral de camundongo. Ou seja, na biologia tumoral, TNFR2 está associado ao acúmulo de Tregs que expressam TNFR2⁺ (CHEN ET AL., 2008). O acúmulo preferencial de TNFR2⁺Tregs em linfócitos que infiltram tumores (TILs) sugerem que a inibição de TNFR2 nesse subconjunto de TILs poderia melhorar a resposta à administração de pequenas doses de TNF exógeno, induzindo à apoptose dessas células.

Em nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo na literatura que compara, simultaneamente, o TNF-alfa e seus receptores solúveis com fatores prognósticos no câncer primário de ovário. Uma das limitações do estudo é uma amostra pequena de pacientes avaliadas. Há necessidade de se encontrar fatores adicionais que definiriam o prognóstico das neoplasias malignas de ovário. Portanto, o estudo de novos marcadores diagnósticos e prognósticos no câncer primário de ovário é importante para uma melhor programação do tratamento cirúrgico e adjuvante das pacientes.

7 CONCLUSÃO

A dosagem de TNF-R2 intracístico é mais alta em neoplasias malignas quando comparado com as neoplasias benignas de ovário, porém não encontramos diferença na dosagem sérica desses marcadores, o que talvez demonstre, que tal substancia possivelmente não seja adequada para o diagnóstico do câncer de ovário. Além disso, valores maiores de TNFR2 intracístico foram encontrados em pacientes com tumores malignos com graus de diferenciação 2 e 3, o que sugere que esse receptor solúvel pode ser um potencial marcador de mau prognóstico em câncer de ovário, podendo alvo de futuras pesquisas de terapias-alvo seletivas anti-TNFR2.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.C.CAMARGO CANCER CENTER. Manual de Condutas em Ginecologia Oncológica / A.C.Camargo Cancer Center, Departamento de Ginecologia. 2 ed.- São Paulo: FAP; 2014.

AGGARWAL BB. Comparative analysis of the structure and function of TNF-alpha and TNF-beta. **Immunol Ser.** 1992;56:61-78.

AGARWAL, R.; KAYE, S. B. Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? **Ann Oncol**, v. 16, n. 1, p. 4-6, 2005.

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

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. CANCER FACTS & FIGURES 2013. Disponível em: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/ACSPC-036845>

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

ATHANASSIADOU, P.; GRAPSA, D.; ATHANASSIADES, P.; GONIDI, M.; ATHANASSIADOU, A.M.; TSIPIS, A.; PATSOURIS, E. The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. **Pathol Res Pract.** 2008;204(4):241-9. Epub 2008 Jan 2.

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.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor: **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 2, p. 135–141, 2002.

BALKWILL F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2006; 25: 409-16.

BELL DA, LONGACRE TA, PRAT J, KOHN EC, SOSLOW RA, ELLENSON LH, MALPICA A, STOLER MH, KURMAN RJ. Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives. **Hum Pathol.** 2004 Aug;35(8):934-48.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. **Front Biosci**, v. 13, p. 2736-2743, 2008.

CHARLES, K. A. et al. The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. **J Clin Invest**, v. 119, n. 10, p. 3011–3023, 2009.

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

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

CIANFRANI T: “A short history of obstetrics and gynecology.” Springfield, IL: CC Thomas; 1960.

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.

DALY M, OBRAMS GI. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. **Semin Oncol**. 1998 Jun;25(3):255-64. Review.

DOBRZYCKA, B; TERLIKOWSKI, SJ; KOWALCZUK, O; KINALSKI, M. Circulating levels of TNF- α and its soluble receptors in the plasma of patients with epithelial ovarian cancer. **Eur. Cytokine Netw.**, Vol. 20 n° 3, September 2009, 131-4.

DONG HP, KLEINBERG L, SILINS I, FLØRENES VA, TROPÉ CG, RISBERG B, NESLAND JM, DAVIDSON B. Death receptor expression is associated with poor response to chemotherapy and shorter survival in metastatic ovarian carcinoma. **Cancer**. 2008 Jan 1;112(1):84-93.

DUMITRU CA, LANG S, BRANDAU S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. **Semin Cancer Biol.** 2013 Jun;23(3):141-8.

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.

FATHALLA, M. F. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia? **Lancet**, v. 2, m. 7716, p. 163, 1971.

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

FERREIRA PA, SALLUM LF, SARIAN LO, ANDRADE LA, DERCHAIN S. [Serous and non-serous ovarian carcinoma: histological tumor type as related to the grade of differentiation and disease prognosis]. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2012 May;34(5):196-202.

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

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

GIUNTOLI RL 2ND, WEBB TJ, ZOSO A, ROGERS O, DIAZ-MONTES TP, BRISTOW RE, OELKE M. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. **Anticancer Res.** 2009 Aug;29(8):2875-84.

GOTO, N. et al. Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNF-R2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Eur J Haematol**, v. 77, n. 3, p. 217-225, 2006.

GOVINDARAJ C, SCALZO-INGUANTI K, MADONDO M, HALLO J, FLANAGAN K, QUINN M, PLEBANSKI M. Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2+ Tregs within the tumor microenvironment. **Clin Immunol.** 2013 Oct;149(1):97-110. doi: 10.1016/j.clim.2013.07.003. Epub 2013 Jul 25.

GUERRIERO S, AJOSSA S, GARAU N, PIRAS B, PAOLETTI AM, MELIS GB. Ultrasonography and color Doppler-based triage for adnexal masses to provide the most appropriate surgical approach. **Am J Obstet Gynecol**. 2005 Feb;192(2):401-6.

GUNDOGDU F, SOYLU F, ERKAN L, TATLI O, MAVI S, YAVUZCAN A. The role of serum CA-125 levels and CA-125 tissue expression positivity in the prediction of the recurrence of stage III and IV epithelial ovarian tumors (CA-125 levels and tissue CA-125 in ovarian tumors). **Archives of Gynecology and Obstetrics**. June 2011, Volume 283, Issue 6, pp 1397–1402

GUPTA M, BABIC A, BECK AH, TERRY K. TNF- α expression, risk factors, and inflammatory exposures in ovarian cancer: evidence for an inflammatory pathway of ovarian carcinogenesis? **Hum Pathol**. 2016 Aug;54:82-91. doi: 10.1016/j.humpath.2016.03.006. Epub 2016 Apr 8.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 6 fev. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>. Acesso em: 9 nov. 2016.

JAMMAL MP, MARTINS-FILHO A, SILVEIRA TP, MURTA EF, NOMEINI RS. Cytokines and Prognostic Factors in Epithelial Ovarian Cancer. **Clin Med Insights Oncol**. 2016 Aug 2;10:71-6. doi: 10.4137/CMO.S38333. eCollection 2016.

KEHOE S, POWELL J, WILSON S, WOODMAN C. The influence of the operating surgeon's specialization on patients survival in ovarian carcinoma. **Br J Cancer** 1994;70:1014-7.

KOUKLAKIS, G. et al. Development of primary malignant melanoma during treatment with a TNF- α antagonist for severe Crohn's disease: a case report and review of the hypothetical association between TNF- α blockers and cancer. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 195-199, 2013.

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

KOLOMEYEVSKAYA N, ENG KH, KHAN AN, GRZANKOWSKI KS, SINGEL KL, MOYSICH K, SEGAL BH. Cytokine profiling of ascites at primary surgery identifies an interaction of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in predicting reduced progression-free survival in epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**. 2015 Aug;138(2):352-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.05.009. Epub 2015 May 20.

KULBE H, THOMPSON R, WILSON JL, ROBINSON S, HAGEMANN T, FATAH R, GOULD D, AYHAN A, BALKWILL F. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. **Cancer Res**. 2007 Jan 15;67(2):585-92.

KURMAN, R. J.; SHIH, Ie-Ming. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 3, p. 433-443, 2010.

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

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

MARSDEN DE., FRIEDLANDER M.: Current Management of Epithelial Ovarian Carcinoma: A Review. **Seminars in Surgical Oncology** 2000; 19:11–19.

MARTINS FILHO A, JAMMAL MP, CÔBO EDE C, SILVEIRA TP, ADAD SJ, MURTA EF, NOMELINI RS. Correlation of cytokines and inducible nitric oxide synthase expression with prognostic factors in ovarian cancer. **Immunol Lett**. 2014 Mar-Apr;158(1-2):195-9. doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.005. Epub 2014 Jan 18.

MAYER AR, CHAMBERS SK, GRAVES E, HOLM C, TSENG PC, NELSON BE, et al. Ovarian cancer staging: does it require a gynecological oncologist? **Gynecol Oncol** 1992;47:223-7.

MIELCZAREK-PALACZ, A.; KONDERA-ANASZ, Z.; SIKORA, J. Higher serum levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors are associated with ovarian tumours. **Arch Med Sci**, v. 8, n. 5, p. 848-853, 2012.

MINARETZIS D, TSIONOU C, TZIORTZIOTIS D, MICHALAS S, ARAVANTINOS D. Ovarian tumors: prediction of the probability of malignancy by using patient's age and tumor morphologic features with a logistic model. **GynecolObstet Invest**, 1994; 38: 140-4.

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.

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.

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

NARASIMHAN, K.; CHANGQING, Z.; CHOOOLANI, M. Ovarian cancer proteomics: Many technologies one goal. **Proteomics Clin Appl**, v. 2, n. 2, p. 195-218, 2008.

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.

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

OMURA GA, BRADY MF, HOMESLEY HD, YORDAN E, MAJOR FJ, BUCHSBAUM HJ, PARK RC. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. **J Clin Oncol**. 1991 Jul;9(7):1138-50.

OPALA T, RZYMSKI P, WILCZAK M, WOŹNIAK J. Evaluation of soluble tumour necrosis factor alpha receptors p55 and p75 in ovarian cancer patients **Eur J Gynaecol Oncol**. 2005;26(1):43-6.

OSMERS RGW, OSMERS M, VON MAYDELL B, WAGNER B, KUHN W. Evaluation of ovarian tumors in the post-menopause by transvaginasonography. **Eur J ObstetGynecolReprodBiol**, 1998; 77: 81-8.

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

PIURA B¹, MEDINA L, RABINOVICH A, DYOMIN V, LEVY RS, HULEIHEL M. Distinct expression and localization of TNF system in ovarian carcinoma tissues: possible involvement of TNF- α in morphological changes of ovarian cancerous cells. **Anticancer Res**. 2014 Feb;34(2):745-52.

PRIES R & WOLLENBERG B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, 17: 141-6.[41] Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK et al. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem Pharmacol** 2006, 72:1605–21.

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

RIVOIRE, W. A. et al. **Neoplasias de ovário e de trompa de Falópio**. In: FREITAS, F.; MENKE, C.; RIVOIRE, W. A. Passos e Rotinas em Ginecologia. 5. ed. Porto Alegre: Ed Artmed, 2006, 362-384.

ROTHER J, GEHR G, LOETSCHER H, LESSLAUER W. Tumor necrosis factor receptors--structure and function. **Immunol Res**. 1992;11(2):81-90.

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

SANKARANARAYANAN R, FERLAY J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. 2006;20(2):207-25.

SAMSAMI DEHAGHANI A, SHAHRIARY K, KASHEF MA et al. Interleukin-18 gene promoter and serum level in women with ovarian cancer. *Mol Biol Rep*. 2009 Nov;36(8):2393-7.

SASI SP, YAN X, ENDERLING H, PARK D, GILBERT HY, CURRY C, COLEMAN C, HLATKY L, QIN G, KISHORE R, GOUKASSIAN DA. Breaking the 'harmony' of TNF- α signaling for cancer treatment. **Oncogene**. 2012 Sep 13;31(37):4117-27. doi: 10.1038/onc.2011.567. Epub 2011 Dec 12.

SCHMELER K.M., SUN C. C., BODURKA D. C., et al. Prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy compared with surveillance in women with BRCA mutations. **Obstet Gynecol** 2006;108(3):515–20.

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

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. **Cancer statistics, 2016**. CA Cancer J Clin. 2016 Jan-Feb;66(1):7-30.

SMITH, H. Clinical Management of Ovarian Cancer [book review]. **N Engl J Med**, v. 345, n. 2, p. 152-153, 2001.

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

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

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

SZLOSAREK, P. W. et al. Aberrant regulation of argininosuccinate synthetase by TNF-alpha in human epithelial ovarian cancer. **Int J Cancer**, v. 121, p. 6-11, 2007.

SZPUREK D, MOSZYNIKI R, ZIETKOWIAK W, SPACZYNSKI M, SAJDAK S. An ultrasonographic morphological index for prediction of ovarian tumor malignancy. **EurGynaecolOncol**, 2005; 26: 51-4

TARTAGLIA LA, GOEDEL DV. Two TNF receptors. **Immunol Today**. 1992 May;13(5):151-3.

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.

TURETSKAYA RL, FASHENA SJ, PAUL NL, RUDDLE NH. Genomic structure, induction, and production of TNF-beta. **Immunol Ser**. 1992;56:35-60.

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.

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

WHITTEMORE AS. Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. **Gynecol Oncol**. 1994;55(3 Pt 2):S15-9.

WOODRUFF J.D. The pathogenesis of ovarian neoplasia. **Johns Hopkins Med J** 1979;144:117-120.

YAWN BP, WOLLAN P, KLEE M, BARRETTE B. Ovarian carcinoma: care and survival in a community-based population. **Clin. Ther**, 2001; 23: 146-59.

YESILYURT H, TOKMAK A, GUZEL AI, SIMSEK HS, TERZIOGLU SG, ERKAYA S, GUNGOR T. Parameters for predicting granulosa cell tumor of the ovary: a single center retrospective comparative study. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014;15(19):8447-50.

ZANETTA G, ROTA S, CHIARI S. The accuracy of staging: An important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. **Ann Oncol** 1998. 9:1097-101.

ZEPERNICK, F.; MEINHOLD-HEERLEIN, I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet*, v. 290, p. 839-842, 2014
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.

9 ANEXOS

**9.1 ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO**

***ANÁLISE DE FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS RECEPTORES EM SORO,
E LÍQUIDO INTRACÍSTICO EM NEOPLASIAS DE OVÁRIO***

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

Uberaba,//.....

 Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

 RG / CPF

Telefone de contato da paciente: _____

 Assinatura do pesquisador responsável
 orientador

 Assinatura do pesquisador

Telefone de contato dos pesquisadores: 34-3318-5326

9.2 ANEXO B – APROVAÇÃO PELO CEP