

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Millena Prata Jammal

*Imunomarcacão epitelial e estromal de citocinas
em neoplasias de ovário*

Uberaba

2015

Millena Prata Jammal

*Imunomarcacão epitelial e estromal de citocinas
em neoplasias de ovário*

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduao em Ciências da Saúde, rea de concentrao “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obteno de Título de Doutor.

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

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido

Murta

Uberaba

2015

MILLENA PRATA JAMMAL

Imunomarcção epitelial e estromal de citocinas em neoplasias de ovário

Tese 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 obtenção de Título de Doutor.

_____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dr.^a Sophie Françoise Mauricette Derchain
Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP

Prof. Dra. Maria Angélica Oliveira Mendonça
Universidade Federal de Uberlândia/UFU

Prof. Dr. David Nascimento Teixeira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

Prof.^a Dr.^a Beatriz Martins Tavares Murta
Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

Dedicatória

À minha mãe Sônia

Por ter me ensinado a viver com dignidade e caráter. Por ter acreditado em mim e me apoiado. Por seu empenho, dedicação e amor incondicional.

À senhora que abriu mão de vários sonhos seus em favor dos meus, me incentivou e me abençoou.

Ao meu marido André

Em cada instante de meu sonho você esteve ao meu lado, e mesmo quando ele pareceu intangível, dividiu-o comigo. Ainda que minhas responsabilidades lhe impusessem a renúncia à minha presença, suportou essa ausência sem se fazer distante. Pela linguagem do sorriso, do olhar, foi incentivo para que, como acontecera com os sonhos, dividíssemos toda a realidade desse momento, em que a extrema alegria nos invade.

Às minhas filhas Rafaela e Giovana

Filhas, por vocês tudo vale a pena.

Vocês são minha inspiração, o ar que eu respiro.

Não sabia que era possível meu coração bater fora do meu corpo!

Ao meu Pai Antônio Carlos Jammal

Você partiu antes que este momento tão esperado chegasse. Partiu deixando uma saudade imensa, um vazio às vezes sufocante. Hoje especialmente, a lembrança de sua voz amiga, do seu sorriso, do seu abraço forte, da sua dedicação, realimentam o amor que jamais apagarei do meu coração. Este amor que me incentivou a ser uma pessoa capaz de chegar até aqui e de concretizar um de nossos sonhos. Este amor me dá a certeza de que você estará sempre ao meu lado.

À minha orientadora Dra. Rosekeila

Pelo exemplo de conduta profissional, pela disponibilidade em ensinar a todo o momento. Pela oportunidade, confiança e incentivo. Pelo seu exemplo de dedicação e humildade.

Ao meu coorientador Dr. Eddie

Obrigada pela oportunidade, pela confiança e aprendizado.

A Deus

"Chamei por ti e tu ouviste-me."

(Salmo de David)

Agradecimentos

*“As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é
infundável.”*

(Madre Teresa de Calcutá)

Ao meu colega de pós-graduação Agrinaldo pelo companherismo, amizade, cumplicidade e apoio.

Ao Cid pela amizade e colaboração.

À Professora Renata Margarida Etchebehere, pela atenção, pela colaboração e disposição.

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

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

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

Aos médicos e residentes da Ginecologia e Obstetrícia pela paciência e apoio nas cirurgias e coleta de material no bloco cirúrgico.

À Eliângela, Luzia, Anusca e Márcio pelos ensinamentos em imuno-histoquímica. Aos demais funcionários da Patologia Cirúrgica, pelo amparo e colaboração; aos mestres da Pós-graduação pelos grandes ensinamentos; e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFIM), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

<i>Introdução</i>	23
<i>Neoplasia Maligna de Ovário</i>	24
<i>Origem</i>	26
<i>Fatores de Risco</i>	28
<i>Diagnóstico</i>	29
<i>Imuno-histoquímica e Marcadores Tumorais</i>	30
<i>Estadiamento e Cirurgia</i>	31
<i>Sistema Imunológico e Câncer</i>	33
<i>Citocinas de Padrão TH1</i>	36
<i>Interleucina 2</i>	35
<i>Interleucina 8</i>	35
<i>TNF-α</i>	35
<i>Citocinas de Padrão TH2</i>	36
<i>Interleucina 5</i>	36
<i>Interleucina 6</i>	36
<i>Interleucina 10</i>	37
<i>Importância do estroma no câncer</i>	37
<i>Hipóteses e Objetivos</i>	39
<i>Material e Métodos</i>	41
<i>Pacientes</i>	42
<i>Critérios de inclusão</i>	43

<i>Critérios de exclusão</i>	43
<i>Anátomo-patológico</i>	43
<i>Imuno-histoquímica</i>	44
<i>Banco de Dados</i>	46
<i>Análise Estatística</i>	46
<i>Resultados</i>	47
<i>Discussão</i>	59
<i>Conclusões</i>	66
<i>Referências Bibliográficas</i>	68
<i>ANEXO A - Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro</i>	80
<i>ANEXO B - Consentimento livre e esclarecido por escrito foi obtido de cada paciente ou de seus familiares</i>	87
<i>ANEXO C - Anticorpos utilizados em imuno-histoquímica</i>	88
<i>ANEXO D - Soluções e tampões utilizados</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	SIGNIFICADO
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
HC-UFTM	Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HE	Hematoxilina-eosina
®	marca registrada
<	Menor
>	Maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
CEP	Comitê de ética em pesquisa
FACs	Fibroblastos associados ao câncer
CD	Células dendríticas
Th	T helper
kDa	Quilodalton
µm	Micrômetro
mM	Milimol
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
DAB	Diaminobenzidine
PBS	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
MHC	Histocompatibilidade
p	Probabilidade
n	número de casos
%	Porcentagem
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TNF-R1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	SIGNIFICADO
CA 125	Cancer Antigen 125
CA 15,3	Cancer Antigen 15,3
CA 19,9	Cancer Antigen 19,9
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
AFP	Alfa-fetoproteína

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1 - Classificação dos tumores ovarianos malignos. Adaptado de World Health Organization Classification of Tumours, 2003..... 25

Tabela 2 - Estadiamento cirúrgico FIGO do câncer ovariano. Adaptado de The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer, 2013..... 31

Resultados

Tabela 3: Variáveis quantitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna ou Benigna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 1999 a 2013.....49

Tabela 4: Variáveis qualitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna ou Benigna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.....50

Tabela 5: Tipo Histológico dos tumores das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.....52

Tabela 6: Tipo Histológico dos tumores das pacientes com Neoplasia Ovariana Benigna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.....52

Tabela 7: Diferenças na marcação tecidual estromal e epitelial por imunohistoquímica de citocinas entre neoplasias malignas e benignas de ovário.....53

Tabela 8: Distribuição das citocinas com imunomarcção estromal 2/3, de acordo com o grau histológico, estadiamento, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença.....57

Tabela 9: Distribuição das citocinas com imunomarcção epitelial 2/3, de acordo com o grau histológico, estadiamento, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença.....	58
--	----

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 - Transferência de epitélio tubário normal do ovário..... 27

Resultados

Figura 2 - Frequência (%) dos tipos de estadiamento para câncer ovariano segundo a Federação Internacional de Obstetrícia e Ginecologia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.....51

Figura 3 – Marcação imuno-histoquímica por IL10, IL5, IL8.....54

Figura 4 – Marcação imuno-histoquímica por IL2, TNF-R1, IL6.....55

RESUMO

Objetivos: Os objetivos do nosso estudo foram verificar as diferenças entre a marcação tecidual estromal e epitelial por imuno-histoquímica das citocinas (IL2, IL8, TNF-R1, IL-5, IL-6 e IL-10) entre neoplasias benignas e malignas primárias de ovário, e avaliar a relação entre marcação estromal e epitelial do câncer ovariano com fatores prognósticos clínicos e patológicos.

Materiais e Métodos: Nós avaliamos prospectivamente 56 pacientes que se submeteram a tratamento cirúrgico por cisto ovariano, de acordo com critérios pré-estabelecidos e com diagnóstico confirmado de neoplasia ovariana. Foi feito o estudo imuno-histoquímico das citocinas (IL2, IL8, TNF-R1, IL-5, IL-6 e IL-10). Os fatores prognósticos foram avaliados usando o Teste Exato de Fisher. O nível de significância foi inferior a 0,05.

Resultados: Das 56 pacientes avaliadas, 28 tinham neoplasias maligna de ovário e 28 benignas. As marcações imuno-histoquímicas de TNF-R1 (estroma e epitélio), IL5 (estroma e epitélio), e IL10 (somente estroma) foram mais fortes nas neoplasias benignas. A marcação de IL2 foi mais forte nas neoplasias malignas comparado às benignas. IL8 teve marcação imuno-histoquímica mais fraca no estroma das neoplasias benignas comparado ao câncer ovariano. Em relação à imunomarcação de IL6, não houve significância estatística. Na avaliação imuno-histoquímica de IL2 no estroma, o grau histológico 3 foi significativamente relacionado com imuno-histoquímica de marcação 2/3 ($p=0,003$). As marcações 2/3 de TNF-R1 foram relacionadas à sobrevida livre de doença ≤ 30 meses, sugerindo um fator de mau prognóstico ($p=0,017$). Não houve diferença significativa em relação a outras citocinas estudadas, tanto na avaliação do estroma como do epitélio.

Palavras-chave: neoplasia ovariana, citocinas, estroma, epitélio, imuno-histoquímica, fatores prognósticos.

ABSTRACT

Objectives: The aims of this study were to determine whether there are differences in tissue stromal and epithelial staining by immunohistochemistry of cytokines (IL2, IL8, TNF-R1, IL-5, IL-6 and IL-10) between benign tumors and malignant primary ovarian tumors, and to evaluate the relationship of stromal and epithelial staining in ovarian cancer with clinical and pathological prognostic factors.

Material and Methods: We evaluated prospectively 56 patients underwent surgical treatment for ovarian cysts in accordance with pre-established criteria and with confirmed diagnosis of ovarian neoplasm. Immunohistochemistry study for cytokines (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF-alpha) was performed. The prognostic factors were evaluated using the Fisher's exact test. The significance level was less than 0.05.

Results: We evaluated 56 patients with ovarian neoplasm (28 malignant and 28 benign neoplasms). The immunohistochemical staining by TNF (stroma and epithelium), IL5 (stroma and epithelium) and IL10 (only stroma) were stronger in benign neoplasms. IL2 immunostaining was stronger in malignant tumors compared with benign tumors. IL8 immunostaining was weaker in the stroma of benign neoplasms compared with ovarian cancer. Regarding IL-6 immunostaining, there was no statistical significance. In evaluating of stromal IL2, the histological grade 3 was significantly correlated with immunohistochemical of score 2/3 ($p=0.003$). TNF-alpha immunohistochemical staining scores 2 or 3 was related to disease-free survival \leq to 30 months, suggesting that it is a factor of poor prognosis ($p=0.017$). There was no statistical significance in relation at other cytokines studied, both in the evaluation of the stroma as the epithelium.

Keywords: ovarian neoplasm, cytokines, stroma, epithelium, immunohistochemical, prognostic factors.

Introdução

1 - Neoplasia maligna de Ovário

O câncer de ovário é uma doença heterogênea, com diferentes tipos histológicos (WATANABE et al., 2014; KÖBEL et al, 2008) Apresenta diagnóstico tardio e alta letalidade devido à falta de biomarcadores sensíveis e específicos e a rápida progressão desse câncer, assintomático em estadiamentos iniciais. Tentativas de se fazer o rastreamento e diagnóstico precoce desta neoplasia em mulheres assintomáticas têm se mostrado pouco eficazes (JIA et al., 2014).

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014) estimam 5.680 casos novos de câncer do ovário para o Brasil, no ano de 2014, com um risco estimado de 5,58 casos a cada 100 mil mulheres. O câncer do ovário é o sétimo mais incidente na maioria das regiões.

De forma geral, o câncer de ovário continua sendo a principal causa de morte entre as malignidades ginecológicas e é a quarta causa mais comum de morte relacionada ao câncer entre as mulheres. O câncer epitelial de ovário é o principal subtipo da doença e é responsável por mais de 90% de todos os tumores malignos ovarianos (GAVALAS et al, 2010).

Sua classificação, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é simplificada pelo agrupamento dos tumores segundo seu comportamento biológico e histogênese (MURTA, NOMELINI, 2006).

Quanto ao potencial de malignidade, os tumores de ovário podem ser divididos em benignos, malignos ou de baixo potencial de malignidade, este último com termo adaptado pela Organização Mundial de Saúde como *borderline*.

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

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

Tumores ovarianos		
Tumores da superfície 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		

Estudos recentes têm proposto um modelo de carcinogênese ovariana que leva em conta a natureza do câncer de ovário correlacionada aos aspectos clínicos, patológicos e moleculares da doença. Neste modelo, os tumores do ovário são divididos em 2 grupos, tipo I e tipo II, conforme suas características patológicas, genéticas e moleculares distintas (KURMAN, SHIH, 2010; ALI-FEHMI et al, 2011; KURMAN, SHIH, 2011).

Os tumores ovarianos do tipo I são tumores de crescimento lento que podem se desenvolver a partir de lesões precursoras, e são denominados tumores limítrofes. Estes incluem tumores borderline serosos com padrão micropapilar, carcinomas serosos de baixo grau, e carcinomas mucinosos, endometrioides e de células claras. Eles geralmente se apresentam como grandes massas, confinados a um ovário (estadio Ia), são geneticamente

estáveis, de bom prognóstico e caracterizados por mutações em diversos genes (KURMAN, SHIH, 2010; ALI-FEHMI et al, 2011; KURMAN, SHIH, 2011).

Em contraste, os tumores do tipo II crescem rapidamente e são altamente agressivos. A maioria está em um estadiamento avançado durante ou logo após o seu início. Exemplos desses tumores são carcinomas serosos de alto grau, tumores mesodérmicos malignos mistos (carcinossarcomas) e indiferenciados. Eles caracterizam-se por mutação de TP53 em 50% a 80% dos casos e um elevado nível de instabilidade genética (KURMAN, SHIH, 2010; ALI-FEHMI et al, 2011; KURMAN, SHIH, 2011).

1.1 - Origem

Em relação à origem do câncer de ovário, muitos pesquisadores têm entendido que os vários tipos de tumores do ovário são todos derivados a partir do epitélio da superfície do ovário (mesotélio) e que alterações posteriores metaplásicas levam ao desenvolvimento dos diferentes tipos de células (DUBEAU, 2008; KURMAN, 2010; KURMAN, 2011).

Os tipos seroso, endometriode, de células claras, mucinoso e de células de transição (Brenner) são carcinomas morfológicamente semelhantes ao epitélio da trompa de Falópio, endométrio, trato gastrointestinal, endocérvice ou bexiga. As células epiteliais do ovário, no entanto, não mostram qualquer semelhança com esses tumores. Uma teoria alternativa propõe que os tumores com um fenótipo *mülleriano* (seroso, célula endometriode e células claras) são derivados de tecido *mülleriano* (DUBEAU, 2008). Este tecido (epitélio colunar, muitas vezes ciliado) forma cistos de localização para-tubária e para-ovariana. De acordo com esta teoria, tumores ovarianos se desenvolvem a partir desses cistos ovarianos, e não do epitélio superficial. Com o crescimento do tumor, que comprime e, finalmente destrói o tecido ovariano, o resultado é um tumor anexial que parece ter surgido no ovário.

As fímbrias da trompa de Falópio normalmente estão em contato íntimo com a superfície de ovulação do ovário durante o período de ovulação. É concebível que quando o epitélio de superfície do ovário é rompido durante a ovulação, células epiteliais tubárias da fímbria são deslocadas e implantadas no ovário formando um cisto de inclusão, onde à partir daí um carcinoma seroso de alto grau poderia se desenvolver. (PIEK et al, 2001; KURMAN, SHIH, 2010; KURMAN, SHIH, 2011) (Figura 1)

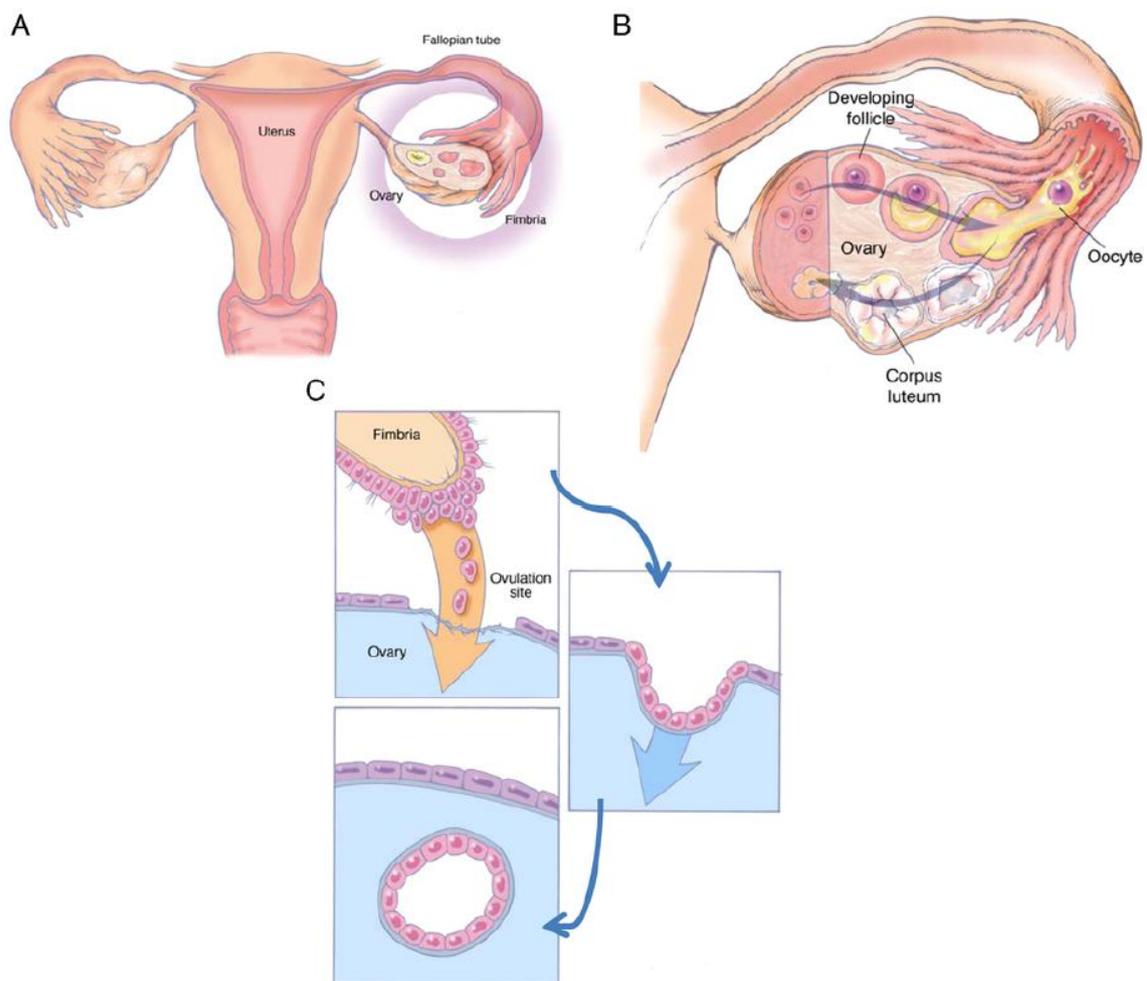


Figura 1 - Transferência de epitélio tubário normal do ovário. A: relação anatômica entre trompas de Falópio com o ovário durante a ovulação. A fímbria envolve o ovário. B: a ovulação. A superfície do ovário rompe com a expulsão e transferência do oócito a fímbria. A fímbria está em contacto íntimo com o ovário no local de ruptura. C: as células epiteliais da fímbria são deslocadas e implantadas na superfície desnuda do ovário, resultando na formação de um cisto de inclusão (KURMAN, SHIH, 2010).

1.2 - Fatores de Risco

Existem várias teorias em relação à carcinogênese em tecido epitelial ovariano. Algumas condições são implicadas com o aumento ou redução do risco. Os fatores de risco mais consistentes estão relacionados com aspectos reprodutivos. Entretanto, há outros fatores estudados, tais como amamentação, infertilidade e laqueadura tubária, que são associados à diminuição da incidência do câncer de ovário (NISIDA, 2000).

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de ovário não relacionados a alterações genéticas são a idade, menarca precoce, menopausa tardia, obesidade e a síndrome dos ovários policísticos. Inibidores da ovulação, como os anticoncepcionais, têm um efeito protetor (PARTRIDGE et al, 2009).

As manifestações clínicas do câncer de ovário são em sua maioria inespecíficas e variam desde desconforto abdominal com mudanças do hábito intestinal, com anorexia e perda ponderal até o encontro de grande massa no abdome e distensão por ascite nos estádios avançados.

Embora o câncer epitelial de ovário possa ocorrer em qualquer idade, é mais comum em mulheres com mais de 50 anos (ROETT, EVANS, 2009).

Segundo alguns autores (FATHALLA, 1971; ZAJICEK, 1978), quanto maior for o período de permanência em anovulação em uma mulher, maior será a proteção do epitélio ovariano a processos carcinogênicos. Os períodos de anovulação correspondem a situações como gravidez, uso de anticoncepcionais hormonais orais, amamentação, pequeno período menstrual na vida reprodutiva, como menarca tardia e menopausa precoce.

Em 1971, Fathalla (1971) propôs que podem ocorrer alterações genéticas na superfície epitelial do ovário em resposta a uma incessante ovulação, por microtraumas e injúrias de repetição. Ele teorizou ainda a possibilidade de ativação de mitoses celulares sucessivas, que podem desencadear mutagênese e, por conseguinte, carcinogênese.

Em 1978, Zajicak (1978) sugeriu que a inclusão cística epitelial na superfície do ovário pode ser fonte de neoplasia, uma vez que há uma relação modesta entre o número de cistos germinativos de inclusão e idade ovulatória, fornecendo evidências que estes podem ser causados durante período ovulatório ou pelo menos associados a ele.

O caráter hereditário está presente em 10% de todos os casos de câncer de ovário. A síndrome de câncer mama-ovário hereditária é a mais comum, representando 85% a 90% de todos os casos de câncer de ovário hereditários identificados (ROETT, EVANS, 2009).

1.3 - Diagnóstico

O câncer de ovário é a neoplasia ginecológica mais letal e a sobrevida global é inferior a 40% em cinco anos, 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). Isto ocorre principalmente porque a maioria das pacientes apresenta estádios avançados no momento do diagnóstico (SMITH, 2001; JEMAL et al, 2010; YANG et al, 2013).

A elevada mortalidade e a pequena proporção de casos de câncer de ovário diagnosticados em estádios iniciais tornam a busca por meios de identificação precoce desta doença essencial (AGARWAL, KAYE, 2005).

A prevenção é limitada pelo pouco conhecimento de suas causas, além da falta de disponibilidade de técnicas para rastreamento e diagnóstico precoce, como biomarcadores sensíveis e específicos (ZHANG et al, 2003).

A sensibilidade e a especificidade do exame ginecológico para o rastreamento de neoplasias ovarianas são questionáveis (MURTA et al, 2004; PADILLA, RADOSEVICH, MILAD, 2005). A ultrassonografia fornece informações importantes sobre o tamanho e conteúdo dos tumores ovarianos, além de ser usada para diferenciar tumores malignos de

benignos (NARASIMHAN, CHANGQING, CHOOLANI, 2008). Associada à imagem colorida com Doppler, avalia a condição vascular do tumor e o fluxo sanguíneo (RIVOIRE et al, 2006). Embora muitos descrevam boa especificidade no método (GARNER, 2005; MURTA, NOMELINI, 2006; NARASIMHAN, CHANGQING, CHOOLANI, 2008), alguns relatam que, apesar de sensível para detectar câncer de ovário em estadios avançados, ocorre falha na detecção de tumores em estadio inicial (OLIVIER et al, 2006).

1.4 – Imuno-histoquímica e Marcadores Tumorais

Nos últimos anos, temos assistido a uma forte expansão no uso de marcadores de imuno-histoquímica na patologia ginecológica. A maioria dos dados publicados refere-se à utilização de anticorpos para o diagnóstico de neoplasias ginecológicas. Em geral, quando a imuno-histoquímica é utilizada para diagnóstico, a visualização de um conjunto de marcadores proporciona uma melhor informação do que a utilização de um único anticorpo (MCCLUGGAGE, 2000; MARJONIEMI, 2004; MCCLUGGAGE, 2006).

Há a hipótese de que a expressão de biomarcadores refletiria no subtipo, diagnóstico e prognóstico do tumor. Ou seja, há variação nas taxas de expressão de biomarcadores e subtipos de carcinoma de ovário (GILKS et al, 2008; KÖBEL et al, 2008).

Estudos indicam que a inflamação é um fator de risco para o câncer de ovário, onde a resposta inflamatória está envolvida em quase todas as fases do desenvolvimento de tumores (WANG et al, 2005; KROCKENBERGER et al, 2008; HANAHAN, WEINBERG, 2011). Tais estudos verificaram uma associação entre inflamação crônica e desenvolvimento do tumor, com progressão deste. O carcinoma epitelial de ovário parece estar associado a inflamação e seu crescimento, sinalização e diferenciação regulados por citocinas (RASPOLINI, TADDEI, 2007; PLEWKA et al, 2014).

A resposta imune mediada por células, que envolve diversos tipos de células do sistema imunológico, compreende a maior parte das respostas imunes contra células tumorais (LIU et al, 2009).

Tem sido sugerido que o crescimento e a progressão do carcinoma de ovário possam estar relacionados a um fenômeno local de imunossupressão induzida por citocinas que podem fornecer um estado de privilégio imunitário no local do tumor, permitindo o desenvolvimento do tumor como mecanismo de escape (RABINOVICH et al, 2010).

1.5 - Estadiamento e cirurgia

O estadiamento ao diagnóstico, grau histológico e volume residual do tumor após primeira cirurgia estão associados à sobrevida. O sistema de estadiamento para câncer ovariano é definido pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) [Tabela 2] e é cirúrgico (ZEPPERNICK, MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

Tabela 2 - Estadiamento cirúrgico FIGO do câncer ovariano. *Adaptado de The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer (ZEPPERNICK, 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 retroperitoneais positivos (comprovado citologicamente ou histologicamente)

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

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

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 peritoneais

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.

2 - Sistema imunológico e câncer

A resposta imune mediada por células de diversos tipos do sistema imunológico compreende uma porção principal das respostas imunitárias contra as células tumorais. Os linfócitos T citotóxicos e as células Natural Killer são as principais células efetoras. Os níveis de infiltração destas células nos tumores têm sido alvo de muitas pesquisas. No entanto, as interações entre os vários tipos de células imunitárias no microambiente tumoral estão ainda em estudo (LIU et al, 2009).

A interação das células tumorais com o sistema imune desempenha papel decisivo no processo da carcinogênese (DRANOFF, 2004).

A resposta adaptativa antitumoral é iniciada pelas células dendríticas (CD) que capturam células tumorais e processam o antígeno para o MHC de classe I e II. As células dendríticas migram para os gânglios linfáticos, e estimulam células T e B específicas para o antígeno. No microambiente tumoral, as CD podem ser ativadas por sinalização produzida por células tumorais necróticas. Ocorre, então, processo de maturação que inclui a expressão de múltiplas citocinas, resultando na resposta mediada pelas células T (MATZINGER, 2002).

O câncer de ovário apresenta alto potencial inflamatório, evidenciado pela presença de infiltrados linfocitários no seu microambiente, os quais se relacionam diretamente à sobrevida das pacientes. O fluxo e as atividades destes infiltrados linfocitários são mediados por

citocinas, sendo estas um reflexo do estado imunológico do hospedeiro, podendo servir como meio de se entender a resposta imune (ZHANG et al., 2003).

Uma das descobertas na área de imunologia foi a identificação de subconjuntos de células TCD4+ T auxiliar ou T helper (Th) que diferem nas citocinas que produzem e nas suas funções efectoras.

Os subconjuntos mais bem definidos de células T efectoras da linhagem auxiliar CD4+ são as células Th1 e Th2. As células Th1 podem mediar respostas imunes contra patógenos intracelulares. Nos seres humanos, desempenham um papel particularmente importante na resistência a infecções por micobactérias. As principais citocinas produzidas são: IFN- γ , IL-10 e IL-2 sendo o IFN- γ a citocina de identificação do perfil de células Th1. O IFN- γ ativa macrófago e IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específico, resultando em doença mais branda ou cura. As células Th2 medeiam a defesa contra parasitas extracelulares. Elas são importantes na indução e persistência da asma e outras doenças alérgicas. As células Th2 produzem, dentre elas: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, sendo que a IL-4 e IL-5 são as citocinas que definem o perfil de células Th2. A IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva (ZHU, PAUL, 2008).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrinos (em células vizinhas) e autócrinos (nas próprias células produtoras) (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As

citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas (SOMMER, WHITE, 2010).

2.1 - Citocinas de padrão TH1

2.1.1 - INTERLEUCINA 2 (IL2)

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

2.1.2 - INTERLEUCINA 8 (IL8) ou CXCL8

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

2.1.3 - FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α)

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

Por meio de enzimas proteolíticas, o TNF- α é capaz de desencadear uma cascata de reações que culminam na apoptose da célula tumoral (BALKWILL, 2006; BALKWILL, 2009).

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, MOCELLIN, 2008). A regulação dos TNF-Rs é um fator crítico para se verificar a capacidade de resposta das células tumorais ao TNF- α .

2.2 - Citocinas de padrão TH2

2.2.1 - INTERLEUCINA 5 (IL5)

A IL-5 é uma interleucina produzida por células T e mastócitos. Suas funções são estimular a produção de células B e aumentar a secreção de imunoglobulinas. Também desempenha um papel essencial na ativação de eosinófilos. (MILBURN et al., 1993).

2.2.2 - INTERLEUCINA 6 (IL6)

A IL-6 influencia a função ovariana e no processo de ovulação, fertilização e implantação (DESPHANDE et al, 2000). Pode estar associada à progressão tumoral através da apoptose de células malignas (TABIBZADEH, 1989; TORRES et al, 2009). Elevadas concentrações de IL-6 podem ser encontradas em neoplasias malignas renais, colorretais, ovário, mama, endométrio e pulmões. Em neoplasias malignas de ovário a IL-6 é relatada como fator prognóstico da doença (AKAHIRO et al, 2004), assim como um fator prognóstico na identificação de tumores resistentes à quimioterapia (BELLONE et al, 2005).

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

2.2.3 - INTERLEUCINA 10 (IL10)

A IL-10 é uma citocina multifuncional produzida pelos linfócitos TH2, e pode inibir a resposta imune do tipo celular e as funções das células TH1 (CD4+) imunocompetentes pelo bloqueio da função de apresentação de antígenos por estas células. É produzida por macrófagos, monócitos e linfócitos. A IL-10 pode exercer vários efeitos sobre o sistema imune e está relacionada à angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas juntamente com a IL-8 (KOZLOWSKI et al., 2003).

Desde a sua descrição original, a IL-10 tem demonstrado ser segregada por vários tipos de células, incluindo células T, monócitos, células B ativadas e alguns tumores humanos. No entanto, que população de células é responsável pelos níveis elevados de IL-10 no soro e ascite de pacientes com câncer de ovário, e como IL10 influencia no desenvolvimento e progressão do carcinoma do ovário permanecem obscuros (RABINOVICH et al, 2010.)

3 - Importância do estroma no câncer

O microambiente do tumor é o ambiente celular no qual existem células tumorais, vasos sanguíneos, células do sistema imunológico, fibroblastos, macrófagos, matriz extracelular e outras moléculas (HUANG et al, 2014).

Estudos mostram que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no comportamento do tumor. As células estromais podem controlar o crescimento de tumores e invasão. Este compartimento tem uma grande influência relacionada com a resposta imune. A infiltração de células imunes em tumores pode até mesmo determinar a evolução e o prognóstico da doença e a interação entre as células neoplásicas e o estroma é um fator crítico para o crescimento do tumor (OTSMAN, AUGESTEN, 2009).

Células estromais têm diferentes perfis de expressão gênica e, portanto, contribuem para a heterogeneidade do tumor (GHESQUIERE et al, 2014; KANG, 2013).

Hipóteses e Objetivos

HIPÓTESES

Espera-se que haja diferença na expressão imuno-histoquímica de citocinas, tais como IL-2, IL-8, TNF-R1, IL-5, IL-6 e IL-10, no estroma e epitélio de neoplasias epiteliais de ovário.

A expressão de tais citocinas no microambiente tumoral possibilita traçar um painel diagnóstico e prognóstico para processos malignos de ovário.

OBJETIVOS

1. Verificar se há diferenças na marcação tecidual estromal e epitelial por imuno-histoquímica de citocinas (padrão TH1: IL-2, IL-8 e TNF-R1; padrão TH2: IL-5, IL-6 e IL-10) entre neoplasias epiteliais benignas e malignas primárias de ovário.

2. Avaliar a relação entre as marcações estromal e epitelial das neoplasias malignas de ovário com fatores prognósticos.

Material e Métodos

1 - MATERIAL

1.1 - Pacientes

Foram avaliadas de forma prospectiva 321 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia/Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, submetidas a tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos, no período de maio de 2009 a dezembro de 2013, entrando para o estudo 56 pacientes com posterior diagnóstico confirmado de neoplasia maligna (n=28) ou neoplasia benigna (n=28) de ovário. Os critérios de indicação de laparotomia exploradora foram: cistos anecoicos com diâmetro máximo menor que 7,0 cm e com persistência da alteração por mais que 6 meses e marcadores tumorais normais; marcadores tumorais alterados; cistos anecoicos com diâmetro máximo maior ou igual a 7,0 cm; massas ovarianas com conteúdo sólido, presença de vegetação intracística, 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).

Foram registrados dados como idade, paridade, tabagismo, história de terapia hormonal, idades da menarca e menopausa, status hormonal, grau histológico, estadiamento (FIGO), tipo histológico, metástases em linfonodos, resposta à quimioterapia (completa, parcial), sobrevida livre de doença maior ou igual a 30 meses. Para a avaliação da sobrevida livre de doença, foram excluídas as pacientes que perderam o seguimento, e o último caso de tumor maligno selecionado para o estudo foi do ano 2011, para que se pudesse avaliar no mínimo 4 anos de seguimento para cada paciente.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro com número de protocolo 1408 (Anexo A). Consentimento livre e esclarecido por escrito foi obtido de cada paciente ou de seus familiares (Anexo B).

1.2 - Critério de inclusão

Diagnóstico pós-operatório de neoplasia maligna ou benigna primária epitelial de ovário pelo anátomo-patológico em parafina.

1.3 - Critérios de exclusão

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

2 - MÉTODOS

2.1 - Anátomo-patológico

Foi realizado pelo Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, nos cortes embebidos em parafina, sendo que os casos foram revisados por um patologista experiente da disciplina de Patologia Especial. A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de acordo com os critérios da International Federation of Gynaecology and Obstetrics – FIGO (ZEPPERINICK, MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

Na avaliação do grau histológico, os tumores *borderline* foram considerados como bem diferenciados (grau 1). Para os demais tumores, foi realizada uma revisão do grau histológico por um patologista, sendo divididos em grau 1 (bem diferenciados), grau 2 (moderadamente diferenciados) e grau 3 (pouco diferenciados).

2.2 - Imuno-histoquímica

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

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

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

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

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

O anticorpo foi diluído em albumina do soro bovina (Sigma[®]) de acordo com as indicações presentes em suas especificações. Essas preparações de albumina bovina (BSA a 2%) e anticorpo primário permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir coloração de fundo. Foram utilizados controles positivos. Os anticorpos primários utilizados no trabalho, diluições e controles estão descritos no Anexo C.

Após a incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico (anti-IL-2, anti-IL-8, anti-TNF-R1, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente, em torno de 15 minutos, lavadas em PBS e secas, como anteriormente. O anticorpo secundário biotilado (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*) foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos, em temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, ocorreram lavagens em PBS, e as lâminas foram secas. O complexo estreptoavidina peroxidase (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*) foi adicionado por 30 minutos nas mesmas condições acima.

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

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

As soluções e tampões utilizados constam no Anexo D.

Três observadores avaliaram as lâminas. A intensidade de marcação foi avaliada subjetivamente utilizando-se 0 a 3: 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação forte) (ÖZEL et al, 2006).

2.3 - Banco de dados

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

2.4 - Análise estatística

Os dados foram analisados pelo GraphPad InStat[®] software. No estudo imunohistoquímico, a concordância entre os três observadores foi realizada através do kappa: $\kappa < 0,4$: concordância fraca; $0,4 \leq \kappa < 0,8$: concordância moderada; $0,8 \leq \kappa < 1,0$: concordância forte; $\kappa = 1,0$: concordância perfeita (ARANGO, 2001). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os casos discordantes foram reavaliados e o resultado foi definido por consenso. Foi utilizado o teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 0,05.

Resultados

Foram avaliadas 56 pacientes com neoplasia maligna (n=28) ou benigna (n=28) de ovário. Em relação às neoplasias malignas, a média de idade foi de $49,9 \pm 14,1$ anos, a média de paridade foi de $2,2 \pm 1,7$ partos, a idade média da menarca foi $13,1 \pm 1,7$ anos, a idade média da menopausa foi $49,7 \pm 4,2$ anos. Em relação ao uso de método contraceptivo, 2 (7,1%) utilizavam contraceptivo hormonal, nenhuma utilizava condom, e 4 (14,3%) foram submetidas à laqueadura tubárea. Uma paciente (3,6%) utilizava terapia de reposição hormonal e 6 pacientes (21,4%) eram tabagistas. Em relação ao status hormonal, 10 (35,7%) estavam no menacme e 18 (64,3 %) estavam na menopausa (tabelas 3 e 4).

Em relação às neoplasias benignas, a média de idade foi de $47,6 \pm 10,5$ anos, a média de paridade foi de $2,8 \pm 1,8$ partos, e a idade média da menarca foi $13,1 \pm 1,6$ anos. Em relação ao uso de método contraceptivo, 6 (21,4%) utilizavam contraceptivo hormonal, nenhuma utilizava condom, e 13 (46,4%) foram submetidas à laqueadura tubárea. Duas pacientes (7,1%) utilizavam terapia de reposição hormonal e 6 pacientes (21,4%) eram tabagistas. Em relação ao status hormonal, 17 (60,7%) estavam o menacme e 11 (39,3 %) estavam na menopausa (tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Variáveis quantitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Epitelial Maligna ou Benigna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.

(n=28)	Média		Desvio Padrão		Mediana		Mínimo		Máximo	
	Malignas	Benignas	Malignas	Benignas	Malignas	Benignas	Malignas	Benignas	Malignas	Benignas
Idade (anos)	49,9	47,6	14,1	10,5	51,0	48,0	25,0	18,0	73,0	69,0
Gestação	2,5	3,0	1,9	1,9	2,0	3,0	0,0	0	8,0	7,0
Paridade	2,2	2,8	1,7	1,8	2,0	3,0	0,0	0	7,0	7,0
Idade Menarca (anos)	13,1	13,1	1,7	1,6	13,0	13,0	9,0	10,0	16,0	17,0
Idade Menopausa (anos)	49,7	48,0	4,2	6,2	50,0	49,0	38,0	32,0	57,0	55,0
Níveis de CA 125 (U/ml)	210,8	28,4	349,9	35,9	46,4	14,55	7,3	0,6	1529,0	161,4
Níveis de CA 15,3 (U/ml)	68,2	16,4	163,0	7,2	22,3	16,6	6,9	6,3	813,0	35,6
Níveis de CA 19,9 (U/ml)	28,8	16,1	49,0	20,9	12,3	7,9	0,8	0,8	225,0	83,5
Níveis de CEA (U/ml)	5,0	2,4	11,0	1,7	1,3	1,8	0,2	0,2	48,7	6,2
Níveis de AFP (U/ml)	43,6	3,4	203,7	5,8	1,7	1,8	0,5	0,6	1000,0	27,8
Volume da massa ao ultrassom (ml)	899,7	450,0	886,5	895,9	645,0	239,0	73,8	6,1	4000,0	4624,0
Maior diâmetro da massa ao ultrassom (cm)	13,4	9,4	4,5	6,2	12,5	8,4	6,6	2,3	21,6	34,1
Sobrevida livre da doença (meses)	37,7		36,5		33,0		0,0		144,0	

Tabela 4: Variáveis qualitativas das pacientes com Neoplasia Ovariana Epitelial Maligna ou Benigna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.

	Grupo Neoplasia Maligna (n=28)		Grupo Neoplasia Benigna (n=28)	
	n	%	n	%
<i>Estado civil</i>				
Casadas	16	57,1	15	53,6
Divorciadas	1	3,6	2	7,1
Solteiras	8	28,6	8	28,6
Viúvas	3	10,7	3	10,7
<i>Método Contraceptivo</i>				
Hormonal	2	7,1	6	21,4
Barreira	0	0	0	0
Laqueadura Tubária	4	14,3	13	46,4
Nenhum	22	78,6	9	32,1
<i>Status Hormonal</i>				
Menacme	10	35,7	17	60,7
Menopausa	18	64,3	11	39,3
<i>Óbito</i>				
Sim	6	21,4	0	0
Não	22	78,6	28	100,0
<i>Terapia Hormonal</i>				
Sim	1	3,6	2	7,1
Não	27	96,4	26	92,9
<i>Tabagismo</i>				
Sim	6	21,4	6	21,4
Não	22	78,6	22	78,6

Quanto ao estadiamento (FIGO), 9 (32,1%) estavam em estágio IA, 2 (7,1%) IB, 2 (7,1%) IC, 1 (3,6%) IIA, 1 (3,6%) IIIA, 1 (3,6%) IIIB, 10 (35,7%) IIIC e 2 (7,1%) IV (Figura 2).

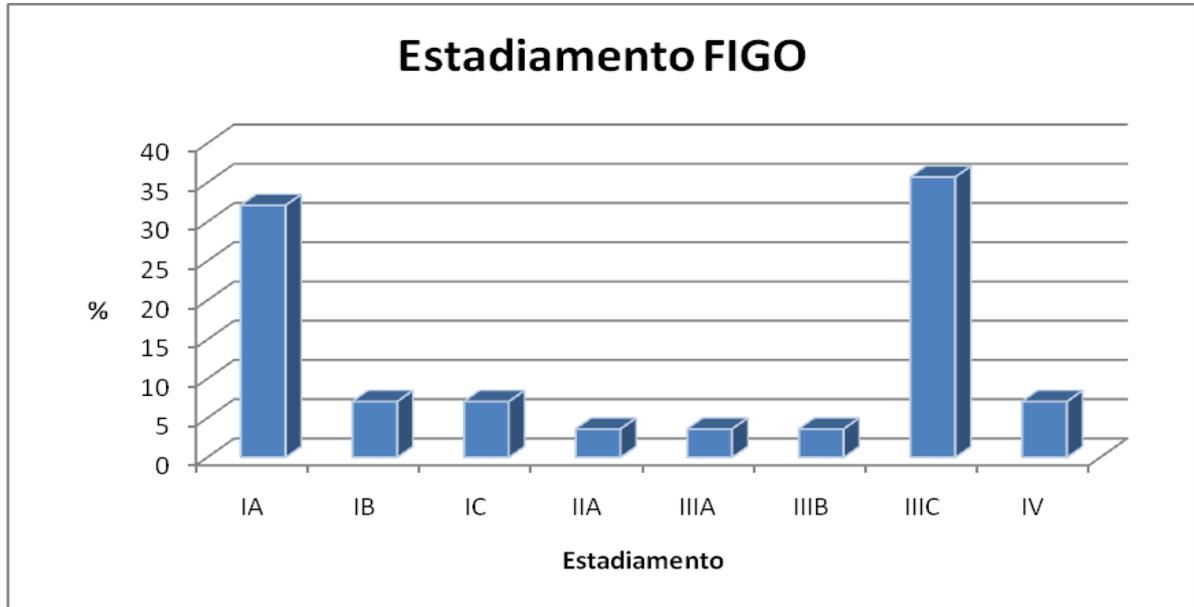


Figura 2. Frequência (%) dos tipos de estadiamento para câncer ovariano segundo a Federação Internacional de Obstetrícia e Ginecologia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.

As tabelas 5 e 6 demonstram os tipos histológicos das neoplasias malignas (Tabela 5) e benignas (Tabela 6) de ovário.

Tabela 5: Tipo Histológico dos tumores das pacientes com Neoplasia Ovariana Maligna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.

	Grupo Neoplasia Maligna (n=28)	
	N	%
Cistoadenocarcinoma seroso	10	35,7
Cistoadenocarcinoma mucinoso <i>borderline</i>	9	32,1
Adenocarcinoma	2	7,1
Cistoadenocarcinoma mucinoso	2	7,1
Adenocarcinoma anaplásico papilífero	1	3,6
Adenocarcinoma endometriode	1	3,6
Carcinoma de células claras	1	3,6
Cistoadenocarcinoma seroso <i>borderline</i>	1	3,6
Tumor endometriode proliferativo atípico <i>borderline</i>	1	3,6

Tabela 6: Tipo Histológico dos tumores das pacientes com Neoplasia Ovariana Benigna, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, no período de 2009 a 2013.

	Grupo Neoplasia Benigna (n=28)	
	N	%
Cistoadenoma Seroso	16	57,1
Cistoadenoma Mucinoso	9	32,1
Cistoadenoma Mucinoso e Tumor de Brenner	2	7,1
Cistoadenoma Seroso e Tumor de Brenner	1	3,6

A tabela 7 demonstra as diferenças na marcação tecidual estromal e epitelial por imuno-histoquímica de citocinas entre neoplasias malignas e benignas de ovário (FIGURAS 3, 4).

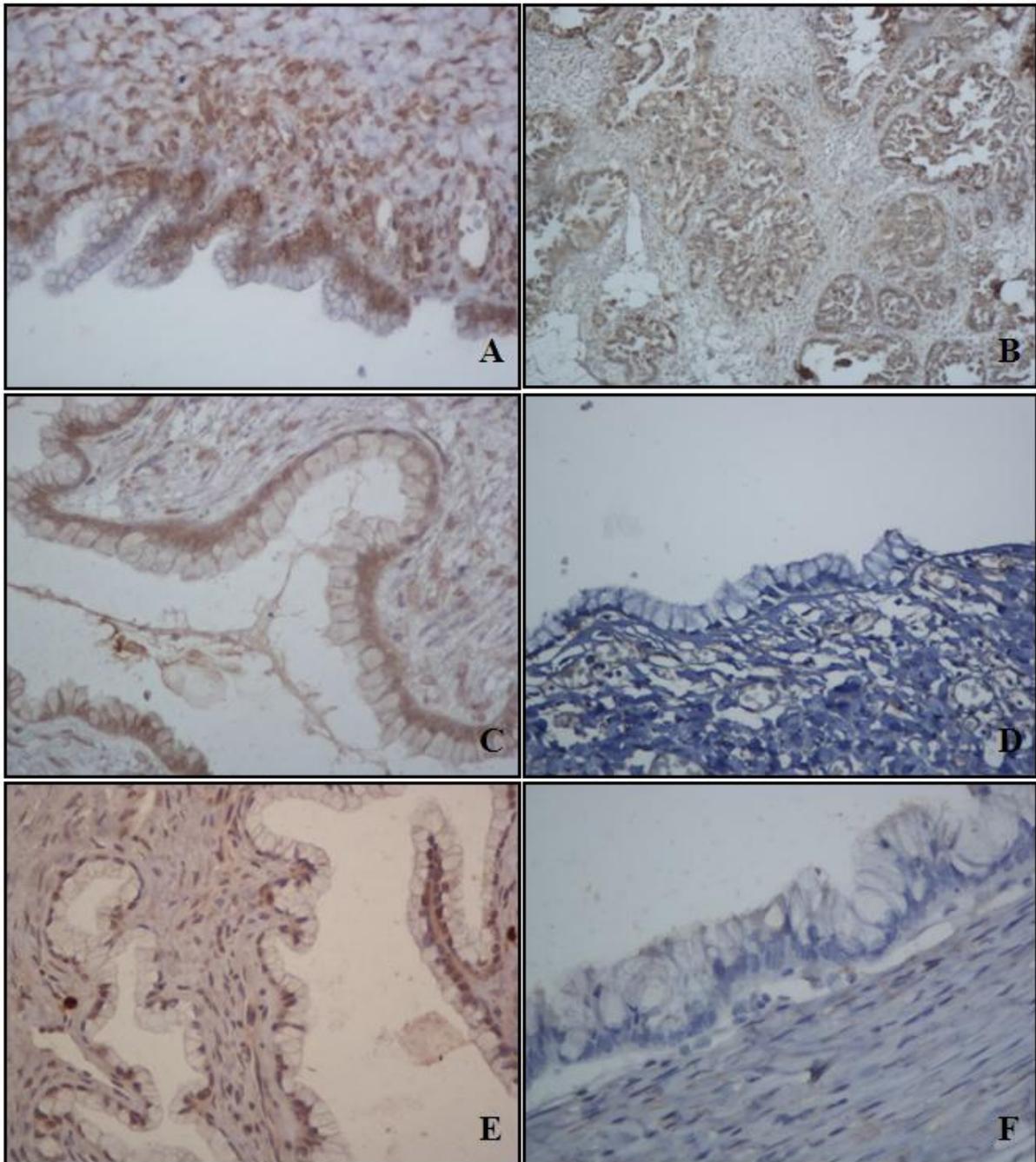
A coloração imuno-histoquímica por TNF-R1 (estroma e epitélio), IL5 (estroma e epitélio) e IL10 (apenas estroma) foram mais fortes (coloração 2/3) em neoplasias benignas. A imunomarcagem de IL2 foi mais forte (coloração 2/3) em tumores malignos em comparação com tumores benignos. A imunomarcagem de IL8 foi mais fraca (coloração 0/1) no estroma de

neoplasias benignas em comparação com câncer de ovário. Em relação à imunomarcagem de IL-6, não houve significância estatística.

Tabela 7: Diferenças na marcação tecidual estromal e epitelial por imuno-histoquímica de citocinas entre neoplasias malignas e benignas de ovário.

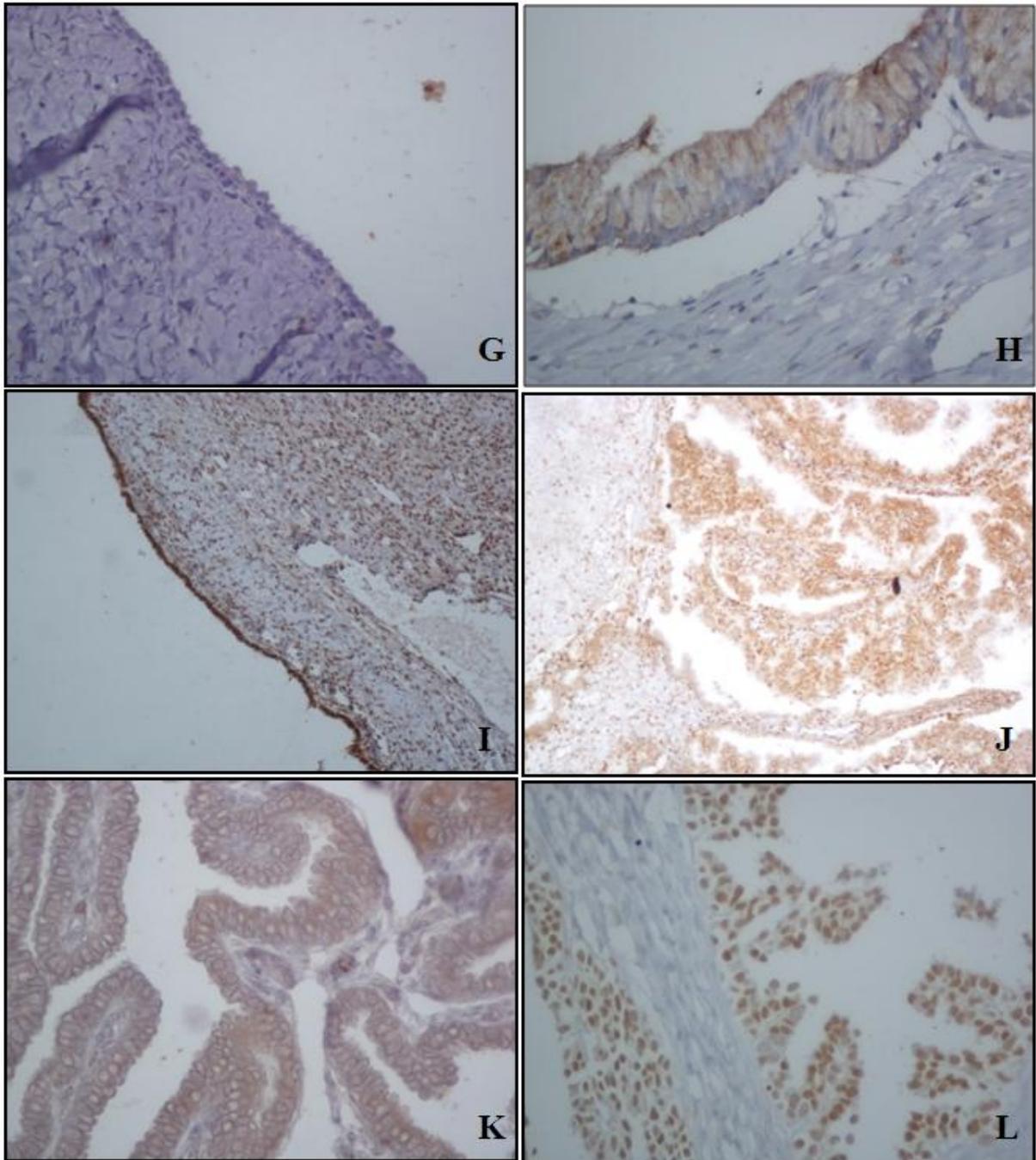
		0 / 1	2 / 3	p
TNF epitelial (n=28)	Neoplasias Benignas	3/28 (10,7%)	25/28 (89,3%)	0,01
	Neoplasias Malignas	12/28 (42,9%)	16/28 (57,1%)	
TNF estromal (n=28)	Neoplasias Benignas	6/28 (21,4%)	22/28 (78,6%)	0,001
	Neoplasias Malignas	19/28 (67,9%)	9/28 (32,1%)	
IL2 epitelial (n=28)	Neoplasias Benignas	26/28 (92,9%)	2/28 (7,1%)	0,0001
	Neoplasias Malignas	2/28 (7,1%)	26/28 (92,9%)	
IL2 estromal (n=28)	Neoplasias Benignas	28/28 (100,0%)	0/28 (0%)	0,004
	Neoplasias Malignas	20/28 (71,4%)	8/28 (28,6%)	
IL5 epitelial (n=28)	Neoplasias Benignas	6/28 (21,4%)	22/28 (78,6%)	0,02
	Neoplasias Malignas	15/28 (53,6%)	13/28 (46,2%)	
IL5 estromal (n=28)	Neoplasias Benignas	9/28 (32,1%)	19/28 (67,9%)	0,0003
	Neoplasias Malignas	23/28 (82,1%)	5/28 (17,9%)	
IL6 epitelial (n=28)	Neoplasias Benignas	8/28 (28,6%)	20/28 (71,4%)	1,0
	Neoplasias Malignas	8/28 (28,6%)	20/28 (71,4%)	
IL6 estromal (n=28)	Neoplasias Benignas	17/28 (60,7%)	11/28 (39,3%)	0,57
	Neoplasias Malignas	20/28 (71,4%)	8/28 (28,6%)	
IL8 epitelial (n=28)	Neoplasias Benignas	10/28 (35,7%)	18/28 (64,3%)	1,0
	Neoplasias Malignas	11/28 (39,3%)	17/28 (60,7%)	
IL8 estromal (n=28)	Neoplasias Benignas	23/28 (82,1%)	5/28 (17,9%)	0,04
	Neoplasias Malignas	15/28 (53,6%)	13/28 (46,2%)	
IL10 epitelial (n=28)	Neoplasias Benignas	4/28 (14,3%)	24/28 (87,7%)	0,2
	Neoplasias Malignas	9/28 (32,1%)	19/28 (67,9%)	
IL10 estromal (n=28)	Neoplasias Benignas	6/28 (21,4%)	22/28 (78,6%)	0,001
	Neoplasias Malignas	19/28 (67,9%)	9/28 (32,1%)	

Teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 0,05.



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 3. Marcações imuno-histoquímicas. Cortes histológicos de neoplasia ovariana. A: forte marcação epitelial e estromal de IL10 em cistoadenoma mucinoso (400x); B: forte marcação epitelial e estromal de IL10 em cistoadenocarcinoma papilífero seroso (400x); C: forte marcação epitelial e estromal de IL5 em cistoadenoma mucinoso (400x); D: fraca marcação epitelial e estromal de IL5 em tumor mucinoso borderline; E: forte marcação epitelial e estromal de IL8 em cistoadenoma mucinoso (400x); F: fraca marcação epitelial e estromal de IL8 em tumor mucinoso borderline (400x).



Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 4. Marcações imuno-histoquímicas. Cortes histológicos de neoplasia ovariana. G: fraca marcação epitelial e estromal de IL2 em cistoadenoma seroso (400x); H: forte marcação epitelial de IL2 em tumor mucinoso borderline (400x); I: forte marcação epitelial e estromal de TNF-R1 em cistoadenoma seroso (400x); J: forte marcação epitelial e estromal de TNF-R1 em cistoadenocarcinoma papilífero seroso; K: forte marcação epitelial e fraca marcação estromal de IL6 em cistoadenoma mucinoso (400x); L: forte marcação epitelial e fraca estromal de IL6 cistoadenocarcinoma papilífero seroso (400x).

As tabelas 8 e 9 mostram a relação entre citocinas estudadas e fatores prognósticos. Na avaliação do estroma, o grau histológico 1/2 foi significativamente relacionado com coloração 0/1 para IL2 ($p = 0,003$). A coloração estromal 2/3 para TNF-R1 foi relacionada à sobrevida livre de doença ≤ 30 meses, sugerindo ser um fator de mau prognóstico ($p = 0,017$). Não houve diferença significativa em relação a outras citocinas estudadas, tanto na avaliação do estroma como no epitélio.

Tabela 8: Distribuição das citocinas com imunomarcção estromal 2/3, de acordo com o grau histológico, estadiamento, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença.

		TNF-R1	IL2	IL5	IL6	IL8	IL10
Grau histológico (n=28)	1/2	7/22 (31,8%)	3/22 (13,6%)	4/22 (18,9%)	6/22 (27,3%)	9/22 (40,9%)	7/22 (31,8%)
	3	2/6 (33,3%)	5/6 (83,3%)*	1/6 (16,7%)	2/6 (33,3%)	4/6 (66,7%)	2/6 (33,3%)
Estadiamento (FIGO) (n=28)	I/II	5/14 (35,7%)	2/14 (14,3%)	2/14 (14,3%)	6/14 (42,9%)	7/14 (50,0%)	4/14 (28,6%)
	III/IV	4/14 (28,6%)	6/14 (42,9%)	3/14 (21,4%)	2/14 (14,3%)	6/14 (42,9%)	5/14 (35,7%)
Metástases em Linfonodos (n=17)	Negativa	4/13 (30,8%)	3/13 (23,1%)	4/13 (30,8%)	4/13 (30,8%)	7/13 (53,8%)	5/13 (38,5%)
	Positiva	1/4 (25,0%)	2/4 (50,0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	2/4 (50,0%)	0/4 (0%)
Resposta à quimioterapia (n=13)	Completa	4/11 (36,4%)	4/11 (36,4%)	2/11 (18,9%)	2/11 (18,9%)	5/11 (45,5%)	4/11 (36,4%)
	Parcial	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/2 (50,0%)	0/2 (0%)
Sobrevida livre da doença (n=25)	≥ 30 meses	2/14 (14,3%)	4/14 (28,6%)	4/14 (28,6%)	5/14 (35,7%)	2/14 (14,3%)	7/14 (50,0%)
	< 30 meses	7/11 (63,6%)**	4/11 (36,4%)	1/11 (9,1%)	3/11 (27,3%)	5/11(45,5%)	2/11 (18,9%)

*p = 0,003, comparando o grau histológico 1/2; **p = 0,017, comparando a sobrevida livre da doença ≥ 30 meses (Teste Exato de Fisher).

Tabela 9: Distribuição das citocinas com imunomarcção epitelial 2/3, de acordo com o grau histológico, estadiamento, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença.

		TNF-R1	IL2	IL5	IL6	IL8	IL10
Grau histológico (n=28)	1/2	13/22 (59,1%)	20/22 (90,9%)	10/22 (45,5%)	17/22 (77,8%)	13/22 (59,1%)	14/22 (63,6%)
	3	3/6 (50,0%)	6/6 (100,0%)	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)	4/6 (66,7%)	5/6 (83,3%)
Estadiamento (FIGO) (n=28)	I/II	11/14 (78,6%)	13/14 (92,9%)	7/14 (50,0%)	10/14 (71,4%)	9/14 (64,3%)	8/14 (57,1%)
	III/IV	5/14 (35,7%)	13/14 (92,9%)	6/14 (42,9%)	10/14 (71,4%)	9/14 (64,3%)	11/14 (78,6%)
Metástases em Linfonodos (n=17)	Negativa	8/13 (61,5%)	13/13 (100,0%)	8/13 (61,5%)	9/13 (69,2%)	7/13 (53,8%)	8/13 (61,5%)
	Positiva	1/4 (25,0%)	3/4 (75,0%)	1/4 (25,0%)	2/4 (50,0%)	3/4 (75,0%)	3/4 (75,0%)
Resposta à quimioterapia (n=13)	Completa	4/11 (36,4%)	10/11 (90,9%)	5/11 (45,5%)	6/11 (54,5%)	7/11 (63,6%)	8/11 (72,7%)
	Parcial	0/2 (0%)	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)
Sobrevida livre da doença (n=25)	≥ 30 meses	6/14 (42,9%)	13/14 (92,9%)	8/14 (57,1%)	10/14 (71,4%)	7/14 (50,0%)	11/14 (78,6%)
	< 30 meses	9/11 (81,8%)	10/11 (90,9%)	2/11 (18,9%)	7/11 (63,6%)	8/11 (72,7%)	5/11 (45,5%)

Não houve significância estatística em relação a essas citocinas estudadas no epitélio (Teste Exato de Fisher).

Discussão

Este estudo avaliou potenciais citocinas que podem ser utilizadas como marcadores no câncer de ovário, tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico da doença. O perfil da resposta imune, cuja diferenciação e proliferação ocorre na produção de certas citocinas, é capaz de contribuir para a indução de apoptose, controle e regressão do tumor (MOSER, MURPHY, 2000).

O desenvolvimento do câncer pode indicar uma falha na resposta imune, tal como o mecanismo de escape do tumor. A possibilidade de intervir e intensificar a ação do sistema imunitário para a produção de uma resposta anti-tumoral benéfica continua sendo uma área de pesquisa intensa. As células tumorais exibem uma variedade de mecanismos que lhes permitem escapar da imunodeteção e destruição, fazendo com que a resposta imune seja ineficaz (RESTIFO, WUNDERLICH, 2005).

A maioria das imunomarcações teciduais por TNF-R1 no epitélio foi encontrada em neoplasias benignas, exibindo uma forte coloração ($p=0,01$). O mesmo resultado foi encontrado no estroma ($p=0,001$). Por meio de enzimas proteolíticas o TNF- α é capaz de desencadear uma cascata de reações culminando em apoptose das células tumorais (BALKWILL, 2006; BALKWILL, 2009).

Embora os estudos demonstrem que o TNF- α desempenha um papel importante na promoção do crescimento do tumor e progressão de neoplasias malignas de ovário (DOBRZYCKA et al, 2009; CHARLES et al, 2009), considerando o sistema imune inato, macrófagos desempenham também um papel central no combate a células cancerosas. Após a maturação e expressão de moléculas co-estimulatórias sobre a superfície, estas células produzem várias citocinas importantes na destruição de todas as células tumorais. Estas células também produzem grandes quantidades de TNF- α , que induz a apoptose das células tumorais através da ativação de caspases. A inflamação crônica induz a um aumento na taxa

de renovação celular, e pode contribuir de diferentes formas para a carcinogênese (DUDLEY et al, 2002; SICA et al, 2008; MACCALLI, SCARAMUZZA, PARMINANI, 2009).

Na imuno-histoquímica de IL2, a maioria das imunomarcações 2/3 foi nas neoplasias malignas. Não existem trabalhos na literatura mostrando o que é o padrão de imunomarcação estromal e epitelial por IL2 no câncer de ovário. A IL2 estimula a proliferação e a ativação das células *natural Killer*, tendo assim atividade antitumoral (SMYTH et al, 2002).

Em relação a IL5, a imunomarcação 2/3 foi mais frequente em neoplasias benignas, tanto no epitélio quanto no estroma ($p=0,02$ e $p=0,0003$, respectivamente). A IL5 é um fator específico de crescimento e diferenciação dos eosinófilos, produzida principalmente por linfócitos T (TAKATSU et al, 1988). Assim como a IL2, não há estudos na literatura correlacionando IL5 e câncer de ovário. É uma citocina relacionada com a modulação, migração e invasão no câncer de bexiga (LEE et al, 2012). Portanto, a nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que demonstra a diferença da imunomarcação entre tumores benignos e malignos de ovário em relação às citocinas IL2 e IL5, o que sugere a importância do papel delas como alvos para futuras pesquisas de novos marcadores de diagnóstico em câncer de ovário.

A imunomarcação mais fraca (0/1) de IL8 no estroma do tecido foi encontrada em neoplasias benignas ($p=0,04$). Os níveis de IL8 no soro pode-se correlacionar com mau prognóstico no câncer de ovário e sobrevida global (SCAMBIA et al, 1995; AKAHIRO, 2004; KASSIM et al, 2004). A principal ação da IL8 é o estímulo migratório das células do sistema imunológico, principalmente neutrófilos, e um aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (BAGGIOLINI, DEWALD, MOSER, 1994).

Não houve significância estatística em relação à marcação imuno-histoquímica de IL6. Existe apenas um estudo na literatura demonstrando que fibroblastos associados ao câncer (FACs) de mama humano e tumores ovarianos expressam altos níveis de fatores pró-

inflamatórios IL6, mas esses autores compararam apenas tecidos ovarianos normais e neoplasias malignas de ovário, mas neoplasias benignas não foram avaliadas (EREZ et al, 2013). Estudos mostram que a expressão de IL6 e IL8 no câncer de próstata têm papel pró-inflamatório na progressão da doença (BARON et al, 2015).

Em relação à IL10, o estroma demonstrou imunomarcção 2/3 mais frequente em neoplasias benignas comparado a tumores malignos ($p= 0,001$). IL10 pode alterar a diferenciação, maturação e função de células dendríticas, aumentando a sua apoptose espontânea e interferindo com a indução de resposta antitumoral (CORINTI et al, 2001).

Nossos resultados mostram que os tecidos de ovário benignos produzem e secretam IL10. Rabinovich et al. (2010) demonstraram que os níveis de proteína IL10 foram significativamente mais elevados em tecidos ovarianos normais em comparação com tecidos cancerosos. De acordo com o autor, em células normais de ovário, a IL10 provavelmente mantém o seu papel autócrino original por inibir a secreção de várias outras citocinas, tais como IL1, IL6, TNF- α e outros fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento e progressão do tumor (MOCELLIN, WANG, MARINCOLA, 2001; VICARI, TRINCHIERI, 2004; RABINOVICH et al, 2010).

Quando os fatores prognósticos foram avaliados, nosso estudo mostrou fraca expressão (0/1) de IL2 no estroma em pacientes com neoplasias bem e moderadamente diferenciadas, e uma expressão mais forte (2/3) em neoplasias pouco diferenciadas. IL2 tem as suas atividades focadas no crescimento e diferenciação de linfócitos T e B, estimulando o crescimento e maturação de células Natural Killer e células dendríticas (MINAMI et al, 1993; KRYCZEK et al, 2007). No câncer do ovário, não existe nenhum estudo que mostra a relação entre a IL2 e fatores prognósticos. Os níveis séricos de sIL2R (receptor solúvel de IL2) < 522 U/ml foram relacionados ao câncer colorretal invasivo em estadiamentos I ou II, onde não há infiltração tumoral de linfonodos (BERGHELLA et al, 2002).

A marcação estromal 2/3 para TNF-R1 foi relacionada à sobrevida livre de doença \leq 30 meses. Isto sugere que a forte coloração de TNF-R1 na neoplasia maligna pode ser um fator de prognóstico ruim. A secreção de TNF-R1 é parte de um dos mecanismos de escape do tumor com o desvio da resposta imune para um perfil Th2 (BALKWILL, CHARLES, MANTOVANI, 2005). Estudos sugerem que o TNF- α conduz à inflamação crônica, angiogênese e outros processos que promovam a iniciação, crescimento e disseminação do tumor (LEBREC, et al, 2015).

TNF-R1 está alterado em tumores malignos comparado com o epitélio de superfície ovariana normal. Vários estudos têm associado a inflamação com a tumorigênese do ovário, com TNF- α desempenhando um papel chave na modulação da invasão, angiogênese e metástase (SZLOSAREK et al, 2007; SETHI, SUNG, AGGARWAL, 2008; DOBRZYCKA 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 também uma forma solúvel, os sTNF-R, e estas formas são antagonistas de citocinas específicas. Elas se ligam no TNF- α circulante e inibem a sua atividade biológica, impedindo a sua ligação aos receptores celulares. Altas concentrações de TNF-R solúvel podem inibir a atividade do TNF e podem, assim, representar um mecanismo de escape do tumor contra os efeitos destrutivos de TNF- α . Embora o papel patogênico real dos sTNF-Rs permaneça controverso, eles têm sido propostos como marcadores fidedignos de local de produção de TNF- α (ANDERSON, NAKADA, DeWITTE, 2004; SZLOSAREK et al, 2007).

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, KONDERA-ANASZ, SIKORA, 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).

Várias estratégias representam a busca de uma terapia mais efetiva. Os anticorpos que reconhecem antígenos associados a tumores podem ajudar no diagnóstico patológico do câncer e ajudar a definir o prognóstico e a detecção de recidivas (AGARWAL, KAYE, 2005).

Em particular, é importante entender que muitos sítios tumorais em um mesmo paciente têm diferentes microambientes imunológicos. O aumento da heterogeneidade nesses locais podem refletir diferenças importantes na biologia estromal e na resposta inflamatória intrínseca (HAGEMANN et al, 2011).

As células estromais têm diferentes perfis de expressão de genes que contribuem para a heterogeneidade do tumor. A compreensão do seu papel no desenvolvimento de tumores é necessária na busca de novas terapias que interfiram na carcinogênese (HUANG et al, 2014; Ko, NAORA, 2014). O estroma peritumoral pode controlar o crescimento tumoral e invasão. Este compartimento é relacionado com a resposta imune. A interação entre as células neoplásicas e do estroma é um fator muito importante para o crescimento do tumor (AKAHANE et al, 2013). Portanto, o compartimento estromal tem sido importante alvo de estudos relacionados com o prognóstico de diversos cânceres.

Existem poucos estudos que avaliam as citocinas teciduais no câncer epitelial de ovário. O papel das citocinas específicas para o desenvolvimento do câncer de ovário, o seu diagnóstico e prognóstico não é bem conhecido. Não há estudos na literatura que mostram um painel imuno-histoquímico de citocinas em neoplasias malignas e benignas de ovário e sua correlação com fatores prognósticos.

Quando analisamos fatores prognósticos em câncer de ovário, temos a intenção de descobrir novos fatores prognósticos e novas terapias-alvo, e prever como será a evolução da

doença. Ou seja, se a paciente tem marcadores de pior prognóstico, um esquema de quimioterapia mais agressiva poderia ser escolhido.

Em relação ao tipo de câncer mais comum em mulheres, o sítio primário que tem o maior número de estudos avaliando fatores prognósticos com novos tratamentos é o câncer de mama. Atualmente, há uma série de tratamentos sistêmicos para esse tipo de câncer, como a terapia hormonal e terapias-alvo. Isso é possível através da elaboração de um painel de imuno-histoquímica que pode prever o prognóstico e auxiliar na escolha do melhor tratamento para cada subtipo molecular. Nossa perspectiva futura é definir um painel de marcadores imuno-histoquímicos que possam ajudar no prognóstico e tratamento do câncer de ovário, já que este se restringe à cirurgia, quimioterapia e poucas opções de terapias-alvo.

Nosso estudo pode ser o primeiro passo para a descoberta de um painel em imuno-histoquímica para o câncer de ovário que demonstre o prognóstico provável da doença e o melhor tratamento, que poderia ser baseado em terapias específicas relacionadas com a IL2 e o TNF-R1. Além disso, o estroma peritumoral parece ter um papel mais importante que o epitélio na progressão tumoral. Assim, poderíamos, no futuro, e com a confirmação da reprodutibilidade de nossos achados, propor o seguinte painel de imuno-histoquímica em câncer de ovário:

Marcação estromal IH	Bom prognóstico	Mau prognóstico
IL2	Negativo (0-1)	Positivo (2-3)
TNF-R1	Negativo (0-1)	Positivo (2-3)

No entanto, são necessários mais estudos com um número maior de pacientes e um maior tempo de seguimento. A continuidade dos estudos com a análise da relação entre citocinas e câncer de ovário poderá nos ajudar a projetar um novo modelo de terapia-alvo.

Conclusões

A maioria das imunomarcações teciduais por TNF-R1 no epitélio e estroma foi encontrada em neoplasias benignas. Na imuno-histoquímica de IL2, a maioria das imunomarcações 2/3 foi nas neoplasias malignas. Para IL5, a imunomarcação 2/3 foi mais freqüente em neoplasias benignas, tanto no epitélio e estroma. A imunomarcação mais fraca (0/1) de IL8 no estroma do tecido foi encontrada em neoplasias benignas. Em relação IL10, o estroma demonstrou imunomarcação 2/3 mais frequente em neoplasias benignas comparado a tumores malignos. Não houve significância estatística em relação à marcação imuno-histoquímica de IL6.

Quando os fatores prognósticos foram avaliados, nosso estudo mostrou fraca expressão (0/1) de IL2 no estroma em pacientes com neoplasias bem e moderadamente diferenciadas, e uma expressão mais forte (2/3) em neoplasias pouco diferenciadas. A marcação estromal 2/3 para TNF-R1 foi relacionada à sobrevida livre de doença ≤ 30 meses.

Referências Bibliográficas

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.

AKAHANE, T. et al. The origin of stroma surrounding epithelial ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Pathol*, v. 32, n. 1, p. 26-30, 2013.

AKAHIRO, J. et al. Impact of serum interleukin-18 level as a prognostic indicator in patients with epithelial ovarian carcinoma. **Int J Clin Oncol**, v. 9, n. 1, p. 42-46, 2004.

ALI-FEHMI, R. et al. Molecular typing of epithelial ovarian carcinomas using inflammatory markers. *Cancer*, v. 117, n. 2, p. 301-309, 2011.

ANDERSON, G. M.; NAKADA, M. T.; DeWITTE, M. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, p. 314-320, 2004.

ARANGO, E. G. Bioestatística teórica e computacional . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 3, p. 104-103.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin 8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. **Adv Immunol**, v. 55, p. 97-179, 1994.

BALKWILL, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 3, p. 409-416, 2006.

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

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-371, 2009.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, p. 211–217, 2005.

BARON, V. T. et al. Early Growth Response 3 regulates genes of inflammation and directly activates IL6 and IL8 expression in prostate cancer. **Br J Cancer**, v. 112, n. 4, p. 755-64, 2015.

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

BENOY, I. H. et al. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. **Br J Cancer**, v. 91, p. 1813–1820, 2004.

BERGHELLA, A. M. et al. Peripheral blood immunological parameters for use as markers of pre-invasive to invasive colorectal cancer. **Cancer Biother Radiopharm**, v.17, n. 1, p. 43-50, 2002.

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.

CORINTI, S. et al. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. **J Immunol**, v. 166, n.7, p. 4312-4318, 2001.

DESPHANDE, R. R. et al. Alterations of cytokine production in follicular cyclic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. **Am J Reprod Immunol**, v. 44, p. 80–8, 2000.

DOBRZYCKA, B. et al. Circulating levels of TNF- α and its soluble receptors in the plasma of patients with epithelial ovarian cancer. **Eur Cytokine Netw**, v. 20, n. 3, p. 131-134, 2009.

DRANOFF, G. R. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11-22, 2004.

DUBEAU, L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. **Lancet Oncol**, v.9, p. 1191–1197, 2008.

DUDLEY, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science**, v. 298, p. 850-854, 2002.

EREZ, N. et al. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 437, n. 3, p. 397-402, 2013.

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

GARNER, E. I. Advances in the early detection of ovarian carcinoma. **J Reprod Med**, v. 50, p. 447-453, 2005.

GAVALAS, N. G. et al. Immune Response in Ovarian Cancer: How Is the Immune System Involved in Prognosis and Therapy: Potential for Treatment Utilization. **Clinical and Developmental Immunology**, ID 791603, 15 pages, 2010.

GHESQUIERE, B. et al. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. **Nature**, v. 511, p. 167–176, 2014.

GILKS, C. B. et al. Tumor cell type can reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. **Hum Pathol**, v. 39, p. 1239–1251, 2008.

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.

GRIMM, E. A. et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. **J Exp Med**, v. 158, n. 4, p. 1356-61, 1983.

HAGEMANN, A. R. et al. Tissue-based immune monitoring II: Multiple tumor sites reveal immunologic homogeneity in serous ovarian carcinoma. **Cancer Biol Ther**, v. 12, n. 4, p. 367-377, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HUANG, R. et al. CD117 Expression in Fibroblasts-Like Stromal Cells Indicates Unfavorable Clinical Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112209, 2014.

HUANG, R. et al. CD117 Expression in Fibroblasts-Like Stromal Cells Indicates Unfavorable Clinical Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

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. 2015.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 5, p. 277–300, 2010.

JIA, L. et al. Inhibitory role of prohibitin in human ovarian epithelial cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 5, p. 2247-2255, 2014.

KANG, Y. Imaging signaling pathways and tumor-stromal interactions in cancer metastasis. **J Nucl Med**, v. 54, p. 32–32, 2013.

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

KO, S. Y.; NAORA, H. Therapeutic strategies for targeting the ovarian tumor stroma. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 6, p. 194-200, 2014.

KÖBEL, M. et al. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. **PLoS Med**, v. 5, n. 12, p. 1749-60, 2008.

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.

KOZLOWSKI, L. et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. **Rocz Akad Med Białymst**, v. 48, p. 82-84, 2003.

KROCKENBERGER, M. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Contributes to the Immune Escape of Ovarian Cancer by Downregulating NKG2D1. **J Immunol**, v. 180, p. 7338-7348, 2008.

KRYCZEK, I. et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. **J Immunol**, v. 178, n. 11, p. 6730-6733, 2007.

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.

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.

LEBREC, H. et al. Tumor Necrosis Factor Inhibition, and Cancer Risk. **Curr Med Res Opin**, v. 4, p. 1-76, 2015.

LEE, S. J. et al. Identification of pro-inflammatory cytokines associated with muscle invasive bladder cancer; the roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e40267, 2012.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

LIU, M. et al. Classification using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. **Mod Pathol**, v. 22, n. 3, p. 373-84, 2009.

MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMINANI, G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+T lymphocytes) in control of human tumors. **Cancer Immunol Immunother**, v. 58, n. 801-808, 2009.

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

MARJONIEMI, V. M. Immunohistochemistry in gynaecological pathology: a review. **Pathology**, v. 36, 109Y19, 2004.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301-305, 2002.

MCCLUGGAGE, W. G. Immunohistochemical and Functional Biomarkers of Value in Female Genital Tract Lesions. **Int J Gynecol Pathol**, v. 25, n. 2, 2006.

MCCLUGGAGE, W. G. Recent advances in immunohistochemistry in the diagnosis of ovarian neoplasms. **J Clin Pathol**, v. 53, p. 327Y34, 2000.

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.

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

MINAMI, Y. et al. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 245-268, 1993.

MOCELLIN, S.; WANG, E.; MARINCOLA, F. M. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. **J Immunother**, v. 24, p. 392-407, 2001.

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nat Immunol**, v. 1, n. 3, p. 199-205, 2000.

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

MURTA, E. F. C.; NOMELINI, R. S. Early diagnosis and predictors of malignancy in the evaluation of adnexal mass. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, p. 14-19, 2006.

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

NISIDA, A. C. T. **Câncer de ovário**: Importância, epidemiologia e fatores de risco. In: Halbe HW. Tratado de Ginecologia. São Paulo: Roca [2000]. p.2242-2245.

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

OTSMAN, A.; AUGESTEN, M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players. **Curr Opin Genet Dev**, v. 19, p. 67-73, 2009.

ÖZEL, E. et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in ovarian surface epithelial carcinomas: is there any correlation with angiogenesis or clinicopathologic parameters? **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, p. 549–555, 2006.

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

PARTRIDGE, E. et al. Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. **Obstet Gynecol**, v. 113, n. 4, p. 775-782, 2009.

PIEK, J. M. et al. Tubal ligation and risk of ovarian cancer. **Lancet**, v. 358, n. 9284, p. 358:844, 2001.

PLEWKA, D. et al. Immunohistochemical visualization of pro-inflammatory cytokines and enzymes in ovarian tumors. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 52, n. 2, p. 124–137, 2014.

RABINOVICH, A. et al. Expression of IL-10 in human normal and cancerous ovarian tissues and cells. **Eur Cytokine Netw**, v. 21, n. 2, p. 122-128, 2010.

RASPOLLINI, M. R.; TADDEI, G. L. Tumor markers in ovarian carcinoma. **Int J Gynecol Obstet**, v. 97, p. 175–181, 2007.

RESTIFO, N. P.; WUNDERLICH, J. R. Molecular biology of cancer: cancer immunology. In: DeVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles and practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 139, 2005.

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.

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

SCAMBIA, G. et al. Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer. **Br J Cancer**, v. 71, n. 2, p. 354-356, 1995.

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

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol**, v. 5, p. 349-355, 2008.

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

SMYTH, M. J. et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 850-861, 2002.

SOMMER, C.; WHITE, F. **Cytokines, Chemokines, and Pain**. In: BEAULIEU, P. et al. Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, ASP Press, p. 279-302, 2010.

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

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

TAKATSU, K. et al. T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL5) molecular and functional properties. **Immunol Rev**, v. 102, p. 107-135, 1988.

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.

TORRES, M. P. et al. Immunopathogenesis of ovarian cancer. **Minerva Med**, v. 100, n. 5, p. 385-400, 2009.

VICARI, A. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? **Immunol Rev**, v. 202, p. 223-236, 2004.

WANG, X. et al. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. **J Transl Med**, v. 3, p. 25, 2005.

WATANABE, T. et al. Serum Levels of Rapid Turnover Proteins Are Decreased and Related to Systemic Inflammation in Patients with Ovarian Cancer. **Oncology Letters**, v. 7, n. 2, p. 373–377, 2014.

XU, L.; FIDLER, I. J. Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer. **Oncol Res**, v. 12, p. 97–106, 2000.

YANG, Ji-Yeon. et al. Predicting time to ovarian carcinoma recurrence using protein markers. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3740–3750, 2013.

ZAJICEK, J. Prevention of ovarian cystomas by inhibition of ovulation: a new concept. **J Reprod Med**, v. 20, n. 2, p. 114, 1978.

ZEPPERINICK, 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. et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 3, p. 203-213, 2003.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-1569, 2008.

Anexos

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



1/7

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

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

SUMÁRIO DO PROJETO

1. OBJETIVOS

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

2. JUSTIFICATIVA

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

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

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



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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

3. DESCRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

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

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

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

5. ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA

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



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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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



5/7

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

IDENTIFICAÇÃO

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

200 μM) com tampão. A quantidade total de metabólitos de NO será então determinada nessas amostras e em amostras de líquido cístico pelo ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1981). A absorbância será medida a 546 nm. Os resultados serão expressos como μM de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ (plasma) ou μM de NO_2 (líquido cístico).

Função fagocítica de neutrófilos - Os neutrófilos obtidos do sangue venoso serão isolados através de meio próprio (Ficoll-Hypaque), lavados com RPMI contendo soroalbumina bovina 0,01% (RPMI-BSA) (3 vezes, 180 g, 10 min) e ressuspensos no mesmo meio ($2 \times 10^6/\text{ml}$). Zimosan sensibilizado (com plasma normal fresco a 10%) será utilizado como partícula fagocítica (12 partículas/neutrófilo), sendo o zimosan (5 mg/ml) diluído em PBS (1 ml). Esta suspensão (10 ml) será colocada em 1 ml de plasma (10%) e incubado (37°C , 5% CO_2) para sensibilização das partículas, sob agitação. Esta mistura será centrifugada (1200 rpm, 10 min) e serão adicionados 1 ml dos neutrófilos. As células e partículas serão incubadas (1 h, 37°C , 5% CO_2) e após as células serão citocentrifugadas e coradas. Serão contadas 100 células em cada lâmina e o número de partículas fagocitadas. Os resultados serão expressos através do Índice Fagocítico= % de células com fagocitose x número médio de partículas fagocitadas.

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

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

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

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

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

Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar, Sala H – Abadia – Cep: 38025-180
 Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854
 E-mail: cep@prodepe.uftm.edu.br



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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

Análise estatística - Os dados serão analisados pelo *GraphPad Instat software*. De acordo com a distribuição (teste de Kolmogorov-Smirnov), os resultados serão expressos em médias ± EPM ou medianas e percentis. Os resultados entre os grupos não pareados (neoplasias benignas e malignas) serão comparados através de teste t ou Mann-Whitney, em caso de distribuição normal ou não, respectivamente. Os grupos pareados (pacientes pré e pós-tratamento) serão comparados através de teste t pareado ou Wilcoxon, em caso de distribuição normal ou não, respectivamente. A avaliação dos fatores prognósticos será realizada pelo teste do qui-quadrado, com nível de significância menor que 0,05. No estudo imunohistoquímico, a concordância entre dois observadores será realizada através do *kappa*: $\kappa < 0,4$: concordância fraca; $0,4 \leq \kappa < 0,8$: concordância moderada; $0,8 \leq \kappa < 1,0$: concordância forte; $\kappa = 1,0$: concordância perfeita (Arango, 2001). As diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

6. ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES

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

7. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

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

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

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

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

10. JUSTIFICATIVA DO USO DE PLACEBO – Não pertinente.

11. ORÇAMENTO FINANCEIRO DETALHADO DA PESQUISA

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

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



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

IDENTIFICAÇÃO

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

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Rosekeila Simões Nomelini

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM

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

PROTOCOLO CEP/UFTM: 1408

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

12. FORMA E VALOR DA REMUNERAÇÃO DO PESQUISADOR

Salário de professor adjunto.

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

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

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

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

PARECER DO CEP: APROVADO

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

DATA DA REUNIÃO: 30-10-2009

Prof. Ana Palmira Soares dos Santos
 Coordenadora

ANEXO B

MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO.

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

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

Uberaba,//.....

 Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

 Documento de identidade

 Assinatura do pesquisador responsável

 Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato da paciente: _____

Telefone de contato dos pesquisadores: 34-3318-5326

ANEXO C

**DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS EM IMUNO-
HISTOQUÍMICA NO ESTUDO**

Anticorpos	Marca	Descrição	Diluições	Controles Positivos
IL2	Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street Dallas, Texas 75220 U.S.A.	IL-2 Antibody (H-133) Rabbit polyclonal IgG sc-7896 Lote #H0811 200 µg/ml	1:200	Tecido de pele humana
IL5	Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street Dallas, Texas 75220 U.S.A.	IL 5 Antibody (H-85) Rabbit policlonal IgG sc – 7887 Lote D0708 200 µg/ml	1:200	Tecido da mucosa oral humana
IL6	Leica Biosystems Nussloch GmbH Heidelberger Straße 17-19 69226 Nussloch (Germany) Registration number: HRB 333205 Tax identification number: DE 811117388	NLC –L-IL-6 Antibody Mouse Monoclonal Lote L155309	1:50	Linfonodo humano
IL8	Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street Dallas, Texas 75220 U.S.A.	IL-8 RB (E-2) Antibody Mouse Monoclonal IgG sc – 7304 Lote F1510 200 µg/ml	1:50	Tecido do pâncreas humano
IL10	ABBIOTEC 7985 Dunbrook Road, Suite A San Diego, CA 92126	IL 10 Antibody Polyclonal Lote 11042807 1mg/ml cat nº 250713	1:600	Colon
TNF-R1	Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street Dallas, Texas 75220 U.S.A.	p-TNF-R1 (ser 274) Antibody Lote B0509 sc-130220 Rabbit policlonal IgG 100µg/ml	1:50	Tecido de cancer humano

ANEXO D

TAMPÕES E REAGENTES UTILIZADOS EM IMUNO- HISTOQUÍMICA

1. Tampão Citrato pH 6.0:

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

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

2. Tampão TRIS/EDTA pH 9.0:

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

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

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

Solução Mãe:

81,7g de Cloreto de sódio

2,69g de Fosfato de sódio dibásico

10,5g de Fosfato de sódio monobásico heptahidratado

0. 5 ml de Tween 20 (DAKO-51966)

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira.

PBS de uso:

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

Conservar a temperatura ambiente.

4. Solução diluente para anticorpo primário (BSA):

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

OPÇÃO (DAKO-53022)

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira.

5. Solução de água oxigenada a 3%:

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