

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MEDICINA TRANSLACIONAL

MARCELA MOISÉS MALUF SANGUINETE

**FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS RECEPTORES NO ESTROMA
DE LESÕES OVARIANAS NÃO NEOPLÁSICAS E NEOPLASIAS
OVARIANAS BENIGNAS E MALIGNAS**

UBERABA MG

2022

MARCELA MOISÉS MALUF SANGUINETE

**FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS RECEPTORES NO ESTROMA
DE LESÕES OVARIANAS NÃO NEOPLÁSICAS E NEOPLASIAS
OVARIANAS BENIGNAS E MALIGNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina Translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões
Nomelini

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando
Candido Murta

UBERABA MG

2022

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

S216f	<p>Sanguinete, Marcela Moisés Maluf Fator de necrose tumoral e seus receptores no estroma de lesões ovarianas não neoplásicas e neoplasias ovarianas benignas e malignas / Marcela Moisés Maluf Sanguinete. -- 2022. 152 f. : il., fig., graf., tab.</p> <p>Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022 Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta</p> <p>1. Neoplasias ovarianas. 2. Biomarcadores tumorais. 3. Monócitos. 4. Plaquetas. 5. Fator de necrose tumoral alfa. 6. TNFR1. 7. TNFR2. I. Nomelini, Rosekeila Simões. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p>
	CDU 618.11-006

MARCELA MOISÉS MALUF SANGUINETE

**FATOR DE NECROSE TUMORAL E SEUS RECEPTORES NO ESTROMA
DE LESÕES OVARIANAS NÃO NEOPLÁSICAS E NEOPLASIAS
OVARIANAS BENIGNAS E MALIGNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina Translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

30/11/2022

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rosekeila Simões Nomelini (Orientadora)

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara

Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Douglas Reis Abdalla

Universidade de Uberaba

Prof^a. Dr^a. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Guilherme Vanucci

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho à minha filha, Isabela Maluf Sanguinete, luz da minha vida, amor incondicional e infinito, minha maior motivação e alegria.

AGRADEÇO

A Deus, por minha vida, por ser meu guia e minha luz, por conceder-me saúde, perseverança e proteção sempre, por me amar incondicionalmente. Sem a fé, nada eu seria. *“Porque todo o que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo: a nossa FÉ”* – João 5:4.

Ao meu esposo Marcos Sanguinete Alencar Souza e a nossa filha Isabela Maluf Sanguinete, por serem meu esteio, aconchego, minha maior motivação para superação, por todo amor, pela compreensão por minhas ausências, pelo estímulo constante, pelo carinho e cuidado, por nossa família maravilhosa. Vocês são minha felicidade!

Aos meus pais, Gontran Maluf Filho e Cláudia Moisés Maluf, pelos bons princípios, exemplo e sabedoria ao orientar meu caminho com o maior amor existente. Cada vitória minha é também de vocês, minha gratificação é poder orgulhá-los. Minha gratidão e amor incondicional são eternos. E aos meus irmãos, **Mateus Moisés Maluf e Mariana Moisés Maluf**, pela amizade, amor e companheirismo em minha vida sempre.

Ao meu tio e eterno professor, Dr. Paulo José Maluf, minha maior referência profissional, pela generosidade em toda a sabedoria transmitida, pelo privilégio de ter sido sua aluna e receber seus ensinamentos, pelo incentivo constante e afeto.

À Professora Dra. Rosekeila Simões Nomelini, pela orientação deste trabalho, pela honra de ter tido a oportunidade de seu convívio e adquirir aprendizado, pelo

incentivo constante e apoio, por ser referência, exemplo profissional e pessoal. Toda a minha admiração e gratidão, eternamente.

Ao professor Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pela coorientação deste trabalho, pela sabedoria e ensinamentos transmitidos, pela ética, competência e profissionalismo sempre destacados.

A Millena Prata Jammal, Elisângela de Castro Côbo e Renata Margarida Etchebehere pelo enorme colaboração, auxílio e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

As médicas residentes de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM: Clícia Chagas Modesto, Fabrícia Fernanda Barros Cruz e Neila Caroline Alves Amaral, pelo auxílio na coleta de dados e colaboração na construção deste trabalho.

A equipe da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da UFTM, em especial à **Andrea Carneiro Bevilaqua Pinheiro, Maria da Fátima Paiva e Simone Quintino Veloso Mendes e Lucas de Aquino Amorim Queiroz**, pelo auxílio e incentivo constante, pela alegria, amizade e afeto sempre.

Aos meus alunos e ex-alunos, responsáveis pelo amor à docência, e **aos meus pacientes**, incentivadores de estudos constantes.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), à Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (**FUNEPU**), à Associação de Apoio à Residência Médica de Minas Gerais (**AREMG**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**), pelo apoio financeiro.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de ovário tem alta letalidade entre as neoplasias ginecológicas. Possui, no estroma peritumoral, vários tipos celulares além das células cancerígenas, que coordenam a sobrevivência, o crescimento, a invasão e a progressão do tumor. O microambiente tumoral possui moléculas que podem ser alvos potenciais para novas terapias contra o câncer. Pacientes com câncer de ovário podem apresentar níveis elevados de TNF e Tregs expressando TNFR2, que está associado à capacidade supressora. Há cada vez mais evidências de que a expressão de TNFR2 no microambiente do câncer tem implicações significativas na progressão do câncer, metástase e evasão imune. Vários estudos têm demonstrado que a associação do TNF-alfa e seus receptores com prognóstico no câncer de ovário podem ser alvos de novas estratégias de tratamento.

OBJETIVOS: O objetivo do estudo foi avaliar a imunomarcção estromal de TNF- α e seus receptores em neoplasias ovarianas malignas, comparando-a com neoplasias ovarianas benignas e lesões ovarianas não neoplásicas; relacionar a imunomarcção com fatores prognósticos clínicos, laboratoriais e patológicos; relacionar sobrevida livre de progressão e sobrevida global na neoplasia maligna de ovário, de acordo com valores de TNF- α e seus receptores.

MATERIAL E MÉTODOS: Pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica foram tratados cirurgicamente de acordo com critérios pré-estabelecidos. Pacientes com neoplasia epitelial ovariana benigna (n=37) ou maligna (n=43) e lesão ovariana não neoplásica (n=15) foram incluídas no estudo. Estudo imuno-histoquímico foi realizado para avaliar TNF-alfa estromal, TNFR1 e TNFR2. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste Qui-Quadrado, com nível de significância inferior a 0,05. Os seguintes dados dos prontuários foram registrados em um banco de dados específico para o estudo: idade, estado hormonal,

tipo histológico, grau histológico, estadiamento (FIGO), tipo de carcinogênese (tipo I e tipo II), parâmetros de hemograma e resultados de imunohistoquímica para TNF-alfa, TNFR1 e TNFR2. Para o estudo imuno-histoquímico, foi utilizada a técnica de estreptoavidina-biotina-peroxidase, e o TNF-alfa e seus receptores foram avaliados no estroma peritumoral. Os valores dos marcadores tumorais e parâmetros do hemograma foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Para os parâmetros que foram estatisticamente significativos, a curva receiver operating characteristic (ROC) foi usada para obter a área sob a curva (AUC) e para determinar os melhores valores de corte entre a imunocoloração fraca (0/1) e forte (2/3). Para os dados com significância estatística, foi realizada análise multivariada. O nível de significância foi inferior a 0,05.

RESULTADOS: A imunocoloração do TNF-alfa estromal foi mais intensa (2/3) comparando neoplasias ovarianas benignas ($p < 0,0001$) e malignas ($p < 0,0001$) com tumores não neoplásicos. A imunomarcação para TNFR1 foi mais forte (2/3) no estroma de neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas ($p < 0,0001$), e mais forte (2/3) quando comparadas neoplasias benignas com lesões ovarianas não neoplásicas ($p = 0,0002$). Para o TNFR2, a imunocoloração do estroma foi mais forte (2/3) nas neoplasias malignas em comparação com as neoplasias benignas ($p = 0,0091$), e mais forte nas neoplasias malignas em comparação com as lesões não neoplásicas ($p = 0,0004$). Para TNF-alfa, analisando as curvas ROC, houve significância estatística para basófilos (valor de corte > 0) e neutrófilos (valor de corte ≤ 3900) entre imunocoloração forte (2/3) e fraca (0/1). Em relação ao TNFR1, foi encontrado um valor de corte de monócitos $> 312/\text{mm}^3$. Em relação ao TNFR2, o valor de corte do CA-125 foi $\leq 95,16\text{U/ml}$. Ainda em relação ao TNFR2, o valor de corte para o número absoluto de plaquetas foi $\leq 298.000/\text{mm}^3$. Não houve significância estatística com os demais parâmetros do hemograma e marcadores tumorais avaliados. Após estabelecer os

valores de corte pelas curvas ROC, foi realizada uma análise multivariada, que mostrou que uma contagem absoluta de monócitos $> 312/\text{mm}^3$ está associada a forte imunomarcção estromal (2/3) de TNFR1, e um valor plaquetário $\leq 298.000/\text{mm}^3$ está associado com forte (2/3) imunocoloração estromal de TNFR2.

CONCLUSÃO: Uma imunomarcção mais forte para TNF-alfa e seus receptores foi encontrada em câncer de ovário, sugerindo que eles podem ser alvos de mais estudos para verificar seu papel na carcinogênese e na progressão de neoplasias ovarianas. A contagem absoluta de monócitos $> 312/\text{mm}^3$ está associada a forte (2/3) imunocoloração estromal de TNFR1, e a contagem de plaquetas $\leq 298.000/\text{mm}^3$ está associada a forte (2/3) imunocoloração estromal de TNFR2.

Palavras-chave: TNF-alfa, TNFR1, TNFR2, tumores ovarianos, monócitos, plaquetas, parâmetros de hemograma, marcadores tumorais, câncer de ovário.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ovarian epithelial cancer has a high lethality among gynecological malignancies. Ovarian cancer has, in the peritumoral stroma, multiple cell types besides cancer cells, which coordinate tumor survival, growth, invasion and progression. The tumor microenvironment has molecules that can be potential targets for new cancer therapies. Patients with ovarian cancer may have high levels of TNF and Tregs expressing TNFR2, which is associated with suppressive capacity. There is increasingly evidence that TNFR2 expression in cancer microenvironment has significant implications in cancer progression, metastasis and immune evasion. Several studies have shown association of TNF-alpha and its receptors with prognosis in ovarian cancer may be targets for new treatment strategies.

OBJECTIVES: The aim of the study was to evaluate the stromal immunostaining of TNF- α and its receptors in malignant ovarian neoplasms, comparing it with benign ovarian neoplasms and non-neoplastic ovarian lesions; to relate immunostaining with clinical, laboratory and pathological prognostic factors; to relate progression-free survival and overall survival in ovarian malignancy, according to TNF- α values and its receptors.

MATERIALS AND METHODS: Patients treated at the Pelvic Mass Outpatient Clinic were surgically treated according to pre-established criteria. Patients with benign (n=37) or malignant (n=43) ovarian epithelial neoplasia, and non-neoplastic ovarian lesion (n=15) were included in the study. Immunohistochemical study was performed to evaluate stromal TNF-alpha, TNFR1 and TNFR2. The comparison between the groups was performed by the Chi-Square test, with a significance level lower than 0.05. The following data from the medical records were recorded in a specific database for the study: age, hormonal status, histological type, histological grade, staging (FIGO), type of carcinogenesis (type I and type II), blood count parameters and immunohistochemistry results for TNF-alpha, TNFR1 and TNFR2. For

the immunohistochemical study, it was utilized streptavidin-biotin-peroxidase technique, and TNF-alpha and its receptors was evaluated in peritumoral stroma. The values of tumor markers and blood count parameters were compared by Mann-Whitney test. For parameters that were statistically significant, the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to obtain the area under the curve (AUC) and to determine the best cutoff values between the weak (0/1) and strong (2/3) immunostaining groups. For data with statistical significance, multivariate analysis was performed. The level of significance was less than 0.05.

RESULTS: TNF-alpha stromal immunostaining was more intense (2/3) comparing benign ($p < 0.0001$) and malignant ($p < 0.0001$) ovarian neoplasms with non-neoplastic tumors. TNFR1 immunostaining was stronger (2/3) in the stroma of malignant neoplasms compared with benign neoplasms ($p < 0.0001$), and stronger (2/3) when comparing benign neoplasms with non-neoplastic ovarian lesions ($p = 0.0002$). For TNFR2, stromal immunostaining was stronger (2/3) in malignant neoplasms compared to benign neoplasms ($p = 0.0091$), and stronger in malignant neoplasms compared to non-neoplastic lesions ($p = 0.0004$). For TNF-alpha, analyzing the ROC curves, there was statistical significance for basophils (cut-off value > 0) and neutrophils (cut-off value ≤ 3900) between strong (2/3) and weak (0/1) immunostaining. In relation to TNFR1, a cut-off value of monocytes $> 312/\text{mm}^3$ was found. Regarding TNFR2, the cut-off value of CA-125 was $\leq 95.16\text{U/ml}$. Still in relation to TNFR2, the cut-off value for the absolute number of platelets was $\leq 298000/\text{mm}^3$. There was no statistical significance with the other parameters of the blood count and tumor markers evaluated. After establishing the cut-off values by the ROC curves, a multivariate analysis was performed, which showed that an absolute monocyte count $> 312/\text{mm}^3$ is associated with strong stromal immunostaining (2/3) of TNFR1, and a platelet value $\leq 298,000/\text{mm}^3$ is associated with strong (2/3) stromal immunostaining of TNFR2.

CONCLUSION: A stronger immunostaining for TNF-alpha e its receptors was found in ovarian cancer, suggesting that they may be targets of further studies to verify their role in carcinogenesis and the progression of ovarian neoplasms. Absolute monocyte count $> 312/\text{mm}^3$ is associated with strong (2/3) stromal immunostaining of TNFR1, and platelet count $\leq 298,000/\text{mm}^3$ is associated with strong (2/3) stromal immunostaining of TNFR2.

Keywords: TNF-alpha, TNFR1, TNFR2, ovarian tumors, monocytes, platelets, blood count parameters, tumor markers, ovarian cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α em Adenocarcinoma Seroso Borderline (100x).

Figura 2 – Imunomarcção estromal (0-1) de TNF- α em tumor não neoplásico (100x).

Figura 3 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α R1 em Adenocarcinoma Seroso Borderline (100x).

Figura 4 – Imunomarcção estromal (0-1) de TNF- α R1 em Cistadenoma Seroso (100x).

Figura 5 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α R2 em Adenocarcinoma Seroso Borderline (100x).

Figura 6 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α R2 em Cistadenoma Mucinoso (100x).

Figura 7 – Frequência do estadiamento das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997 a 2020, segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.

Figura 8 – Frequência do Grau Histológico das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e

Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020, segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.

Figura 9 – Frequência do Subtipo Molecular das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020, segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.

Figura 10 – Sobrevida livre de doença em imunomarcção fraca e forte de TNF- α (p=0,835).

Figura 11 – Sobrevida livre de doença em imunomarcção fraca e forte de TNFR1 (p=0,291).

Figura 12 – Sobrevida livre de doença em imunomarcção fraca e forte de TNFR2 (p=0,244).

Figura 13 – Sobrevida global em imunomarcção fraca e forte de TNF- α (p=0,507).

Figura 14 – Sobrevida global em imunomarcção fraca e forte de TNFR1 (p=0,892).

Figura 15 – Sobrevida global em imunomarcção fraca e forte de TNFR2 (p=0,834).

Figura 16: Curvas ROC relacionando imunomarcção estromal forte (2/3) e fraca (0/1) de TNF-alfa com contagem absoluta de basófilos e neutrófilos, TNFR1 com contagem absoluta de monócitos e valor de CA 125 e TNFR2 com contagem absoluta de plaquetas.

Figura 17: Diferenças nas medianas das contagens absolutas de monócitos nos grupos de imunomarcção fraca e forte de TNFR1, e as diferenças das medianas das contagens absolutas de plaquetas nos grupos de imunomarcção fraca (0/1) e forte (2/3) de TNFR2 (p= 0,0266 e p=0,0321, respectivamente).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento cirúrgico FIGO do câncer ovariano.* Adaptado do estadiamento estabelecido pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) e o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), AJCC Cancer Staging Manual, ed. 8. New York, Springer, 2017.

Tabela 2 – Classificação histológica dos tumores ovarianos. Adaptado de World Health Organization Classification of Tumours, 2003 (TAVASSOLI, DEVILEE, 2003).

Tabela 3 – Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Benignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

Tabela 4 – Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

Tabela 5 – Classificação Histológica das pacientes com Lesões não neoplásicas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

Tabela 6 – Diferenças na marcação tecidual estromal por imunohistoquímica das citocinas entre neoplasias malignas, benignas e lesões não neoplásicas de ovário das pacientes

atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997 a 2020.

Tabela 7 – Relação da marcação tecidual estromal por imunohistoquímica das citocinas e fatores prognósticos patológicos, clínicos e laboratoriais em neoplasias malignas de ovário.

Tabela 8 – Análise multivariada das variáveis: idade, status hormonal, grau histológico, tipo de câncer de ovário, estadiamento e contagem absoluta de monócitos considerando imunomarcção estromal para TNFR1.

Tabela 9 – Análise multivariada das variáveis idade, status hormonal, grau histológico, tipo de câncer de ovário, estadiamento, Ca-125 sérico e contagem absoluta de plaquetas considerando a imunomarcção estromal com TNFR2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACS – American Cancer Society

BRCA1 – Gene supressor de tumor *breast cancer 1*

BRCA2 – Gene supressor de tumor *breast cancer 2*

CA- 19.9 – Antígeno do câncer 19.9

CA125 – Antígeno do câncer 125

CA-15.3 – Antígeno do câncer 19.9

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fig – Figura

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FoxP3+ - Forkhead box P3

G1 – Grau 1

G2 – Grau 2

G3 – Grau 3

IL – Interleucina

IL-10 – Interleucina 10

IL-2 – Interleucina 2

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

INCA – Instituto Nacional de Combate ao Câncer

IPON – Instituto de Pesquisa em Oncologia

n – número

pg/ml – Picogramas por mililitros

RNL – Relação Neutrófilo sobre Linfócito

RPL – Relação Plaqueta sobre Linfócito

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

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

Tab – Tabela

TH1 – T Helper 1

TH2 – T Helper 2

TNF-R – Receptor do fator de necrose tumoral

TNF-R1 – Receptor R1 do fator de necrose tumoral

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNR-R2 – Receptor R2 do fator de necrose tumoral

TP53 – Tumor Protein 53 (gene p53)

Tregs – Células T regulatórias

Tu – Tumor

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Sumário

INTRODUÇÃO.....	18
1 CÂNCER DE OVÁRIO.....	19
1.1 EPIDEMIOLOGIA	19
1.2 CLASSIFICAÇÃO TUMORAL	21
1.3 FATORES DE RISCO E FATORES PROTETORES.....	26
1.4 DIAGNÓSTICO, RASTREAMENTO E DETECÇÃO PRECOCE	27
1.5 TNF, INFLAMAÇÃO E O MICROAMBIENTE TUMORAL.....	28
2 JUSTIFICATIVA	34
3 HIPÓTESE	36
4 OBJETIVOS	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 PACIENTES.....	41
Critérios De Indicação De Laparotomia Exploradora	41
Critério De Inclusão.....	42
Critérios De Exclusão	42
Variáveis Analisadas	42

Cálculo Amostral	42
5.2 MÉTODOS.....	43
Estudo Anátomo-Patológico.....	43
Imuno Histoquímica	43
Avaliação do hemograma e marcadores tumorais	49
Análise Estatística	50
Redação do Texto	50
6 RESULTADOS	51
7 DISCUSSÃO.....	74
8 CONCLUSÃO.....	84
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
10 ANEXOS.....	99
<i>ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</i>	<i>100</i>
<i>ANEXO B – Aprovação pelo CEP.....</i>	<i>101</i>
<i>ANEXO C - DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NA IMUNO- HISTOQUÍMICA DO ESTUDO.....</i>	<i>114</i>
<i>ANEXO D - ARTIGOS REFERENTES À TESE</i>	<i>116</i>

INTRODUÇÃO

1. CÂNCER DE OVÁRIO

1.1 Epidemiologia

O câncer é um grave problema de saúde mundial, devido à impactante morbimortalidade. O comportamento maligno da doença é decorrente de defeitos na regulação de proliferação celular e resistência a apoptose, associado a capacidade de invasão e metastatização, e evidencia uma falha na defesa imune. A possibilidade de que os cânceres possam ser erradicados pelas respostas imunológicas específicas tem sido impulso para uma grande quantidade de pesquisas e estudos na área da imunologia tumoral (CHARLES, 2009).

O câncer de ovário apresenta destaque na oncologia devido à sua alta letalidade. É a segunda mais letal dentre as neoplasias ginecológicas, excetuando-se o câncer de mama (GLOBOCAN, 2020). A maioria dos diagnósticos (>80%) é tardio, em estágio avançado, quando o tumor se espalhou para a cavidade peritoneal e órgãos abdominais superiores, após a doença já ter ultrapassado a cavidade pélvica. (KURORI & GUNTUPALLI, 2020).

No Brasil, o câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum, atrás apenas do câncer do colo do útero. A quase totalidade das neoplasias ovarianas (em torno de 95%) é derivada das células epiteliais. O restante provém de células germinativas e células estromais (INCA, 2022). Para o ano de 2020, a estimativa de casos novos foi de 6.650, e o número de óbitos de 3.921 (2020 - Atlas de Mortalidade por Câncer - SIM) (INCA, 2022). Para o ano de 2022, as estimativas da *American Cancer Society* para este tipo de câncer nos Estados Unidos são de cerca de 19.880 novos diagnósticos de câncer de ovário. Cerca de 12.810 mulheres morrerão dessa patologia.

Em um levantamento no ano 2018, o câncer de ovário foi classificado como o sétimo câncer feminino mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 240.000 novos indivíduos (VAFADAR et al., 2020).

A taxa de sobrevida em cinco anos para câncer de ovário em estádios iniciais (I, II) é de cerca de 90%, enquanto apenas 20 a 40% das pacientes com câncer de ovário em estádios tardios (III, IV) vivem além de cinco anos. Apesar dos avanços no tratamento, as pacientes com câncer de ovário têm uma sobrevida global em cinco anos de 45%, característica de sua alta letalidade. Cerca de três quartos dos cânceres de ovário epiteliais invasivos apresentam sintomas apenas em estágio avançado, enquanto os pacientes em estágio inicial apresentam apenas alguns sintomas leves e inespecíficos (Cancer Research UK, 2022).

Mudanças da estrutura etária da população, seu comportamento reprodutivo e hábitos de vida estão repercutindo em um aumento da incidência dessa patologia, outros fatores que corroboram com esse dado são as mudanças da classificação histológica da doença, assim como a ampliação do acesso aos exames diagnósticos. A respeito da mortalidade, além do diagnóstico tardio, consideram-se os mesmos fatores de risco da incidência, uma vez que a letalidade por este câncer é alta e as inovações diagnósticas e terapêuticas não conseguiram promover aumento significativo na sobrevida. Grande proporção desta doença ainda é diagnosticada em estágio avançado, devido ao seu caráter insidioso e a inexistência de um exame diagnóstico que permita seu uso para o rastreamento em nível populacional (MEIRA et al., 2019). Ao contrário de outros exames usados para diagnóstico precoce (como a mamografia) ou até mesmo em fase pré-invasiva (como a citologia oncótica cervicovaginal), o custo para realização de exames de rastreio para câncer de ovário não é justificável por sua pouca praticidade e baixa especificidade, além de ausência de evidências científicas de melhoras no diagnóstico, tratamento e/ou prognóstico.

1.2 Classificação Tumoral

Existem diversas formas de classificação da neoplasia ovariana. Dentre elas, destaque: Estadiamento (Tabela 1), classificação histológica (Tabela 2), grau de diferenciação celular (1, 2 ou 3), classificação molecular (tipo I e tipo II),

Tabela 1 – Estadiamento cirúrgico FIGO do câncer ovariano.* Adaptado do estadiamento estabelecido pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) e o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), AJCC Cancer Staging Manual, ed. 8. New York, Springer, 2017.

Estádio	Descrição
I	Tumor limitado aos ovários ou às trompas de Falópio
• IA	Tumor limitado a um ovário (cápsula intacta) ou superfície da trompa de Falópio; nenhuma célula maligna no líquido ascítico ou nos lavados peritoneais
• IB	Tumor limitado a um ou ambos os ovários (cápsula intacta) ou trompas de Falópio; nenhum tumor na superfície externa do ovário ou trompa de Falópio; e nenhuma célula maligna no líquido ascítico ou nos lavados peritoneais
• IC	Tumor limitado a um ou ambos os ovários ou às trompas de Falópio, mais qualquer um dos seguintes:
• IC1	• Extravasamento cirúrgico
• IC2	• Cápsula rompida antes da cirurgia ou tumor na superfície do ovário ou trompa de Falópio
• IC3	• Células malignas no líquido ascítico ou em lavados peritoneais
II	Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou trompas de Falópio com

	extensão pélvica (abaixo da borda pélvica) ou câncer peritoneal primário
• IIA	Extensão e/ou implantes no útero, trompas de Falópio e/ou ovários
• IIB	Extensão e/ou implantes em outros tecidos intraperitoneais pélvicos
III	Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou trompas de Falópio ou câncer peritoneal primário com metástases peritoneais confirmadas microscopicamente fora da pelve e/ou metástase nos linfonodos retroperitoneais
• IIIA	Linfonodos retroperitoneais positivos, com ou sem metástases peritoneais microscópicas que se estendem para além da pelve
• IIIA1	Somente linfonodos retroperitoneais positivos (comprovados histologicamente)
• IIIA1 (I)	Metástases ≤ 10 mm na maior dimensão
• IIIA1 (II)	Metástase > 10 mm na maior dimensão
• IIIA2	Envolvimento peritoneal microscópico extrapélvico (para além da borda pélvica), com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos
• IIIB	Metástases peritoneais macroscópicas que se estendem para além da pelve e têm ≤ 2 cm de diâmetro na maior dimensão, com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos
IIIC	Metástases peritoneais macroscópicas que se estendem para além da pelve e têm > 2 cm na maior dimensão, com ou sem comprometimento dos linfonodos retroperitoneais (como extensão do tumor à cápsula hepática e à esplênica sem atingir o parênquima de nenhum dos órgãos)
• IIIC	
IV	Metástases à distância
• IVA	Derrame pleural com citologia positiva
• IVB	Metástase parenquimatosa hepáticas ou esplênicas e/ou metástases em

	órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal) e/ou envolvimento transmural do intestino
Adaptado do estadiamento estabelecido pela <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> (FIGO) e o <i>American Joint Committee on Cancer</i> (AJCC), <i>AJCC Cancer Staging Manual</i> , ed. 8. New York, Springer, 2017.	

As neoplasias malignas de ovário também podem ser classificadas por seu tipo histológico (Tabela 2). Os tumores de origem epitelial são os mais frequentes, sendo responsáveis por mais de 90% dos casos. As neoplasias malignas epiteliais têm origem no mesotélio celômico embrionário presente na superfície ovariana, através da formação de um cisto no interior da cápsula ovárica. Este cisto apresenta crescimento por período indeterminado antes de ter capacidade de formação de metástases (PIVER, BARLOW, LELE, 1978; RUBIN, 1992; MURTA, ANDRADE, BIGHETTI, 1995).

A classificação da Organização Mundial da Saúde de tumores tubo-ovarianos inclui tumores epiteliais comuns, tumores estromais do cordão sexual, tumores de células germinativas, tumores de tecidos moles, tipo não classificado e tumores secundários metastáticos (5-6% das massas anexiais são metástases de mama, trato gastrointestinal, ou trato urinário). (KURORI & GUNTUPALLI, 2020).

Tabela 2 – Classificação histológica dos tumores ovarianos. 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		

A neoplasia maligna ovário é classificada em um grau, de acordo com a intensidade de diferenciação celular existente na lesão. Os carcinomas epiteliais de ovário de grau 1 são pouco diferenciados quando comparados ao tecido normal, e tendem a ter um prognóstico melhor. Os carcinomas epiteliais de ovário de grau 2 apresentam diferenciação celular moderada e os de grau 3 são os mais indiferenciados, e apresentam pior prognóstico, pior resposta terapêutica. (CHARKHCHI et al., 2020).

Outra forma de classificação tumoral é a partir de sua apresentação molecular, podendo ser classificado com tipo I ou tipo II. Esse modelo dualista de carcinogênese ovariana condensa os principais subtipos histopatológicos em tipo I e tipo II com base em componentes clínicos, genéticos e de desenvolvimento. Os cânceres de ovário tipo I e II são

doenças diferentes com implicações de desenvolvimento e prognósticos variadas. Em termos de diagnóstico, cerca de 30% dos carcinomas ovarianos diagnosticados são do tipo I e 70% são do tipo II (CHARKHCHI et al., 2020).

Os tumores do tipo I tendem a crescer lentamente e causar menos sintomas. Esses tumores também parecem não responder bem à quimioterapia. São considerados tumores ovarianos do tipo I os tumores *borderline* serosos, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos, endometrioides e de células claras. Esses tumores desenvolvem-se de maneira gradual a partir de tumores limítrofes e geralmente são diagnosticados em estádios iniciais (I, II), e costumam ter prognóstico favorável, sendo responsáveis por 10% das mortes relacionadas ao câncer de ovário. Pacientes com tumores do tipo I são tipicamente diagnosticados nos estádios iniciais e têm um prognóstico favorável a longo prazo. O diagnóstico precoce de câncer de ovário no estágio I foi considerado o fator prognóstico mais importante para pacientes com câncer de ovário (CHARKHCHI et al., 2020).

Os tumores do tipo II crescem rapidamente e tendem a se espalhar mais cedo. Esses tumores tendem a responder melhor à quimioterapia. O carcinoma seroso de alto grau (grau 3) é um exemplo de tumor do tipo II. São também considerados tumores do tipo II os tumores mesodérmicos malignos mistos (carcinossarcomas) e indiferenciados (KURMAN & SHIH, 2010; ALI-FEHMI et al., 2011; KURMAN & SHIH, 2011). Sabe-se que a maioria dos tumores do tipo II se desenvolve a partir das trompas de Falópio na forma de carcinomas intraepiteliais tubários serosos microscópicos (STIC). Esses tumores geralmente são diagnosticados em estádios avançados (III, IV), quando a cura não é provável, e apresentam características morfológicas e genéticas moleculares distintas em relação aos tumores do tipo I. Os tumores do tipo II são responsáveis por 90% das mortes relacionadas ao câncer de ovário. Alguns grupos de pesquisa propõem que os tumores do tipo II deveriam ser o foco de uma triagem extensa, a fim de que sejam identificadas melhorias no potencial de detecção

desses cânceres mais agressivos, em estádios nos quais o tratamento ideal seja possível (CHARKHCHI et al., 2020).

1.3 Fatores de Risco e Fatores Protetores

O risco de câncer de ovário é inversamente correlacionado com paridade, uso de anticoncepcional oral, histerectomia e cirurgia de laqueadura. Uma história familiar de câncer de ovário é conhecida como o fator de risco mais importante. Outros fatores de risco modestos incluem obesidade e terapia de reposição hormonal (Cancer Research UK, 2022).

Em geral, os principais fatores associados ao câncer do ovário podem ser classificados como história familiar (alterações nos genes *Brc1* e *Brc2*, outras alterações gênicas hereditárias, síndrome de cânceres familiares), idade, fatores reprodutivos (nuliparidade, infertilidade, menarca precoce, menopausa tardia, endometriose), fatores relacionados aos hábitos e estilo de vida (obesidade, tabagismo, aumento do consumo de carnes e gorduras, inatividade física) e exposição ocupacional (talco, asbestos). A importância dos fatores de risco e proteção no processo de carcinogênese do câncer do ovário depende do seu tipo histológico. Os fatores reprodutivos apresentam um papel de destaque na história natural dos carcinomas de origem epitelial (MEIRA et al., 2019; American Cancer Society, 2022).

São considerados fatores redutores de risco, ou protetores contra o câncer de ovário, os períodos anovulatórios devido a uso de contraceptivos orais, multiparidade, amamentação. A salpingooforectomia bilateral e a laqueadura tubária também são consideradas redutoras de risco (INCA, 2022).

1.4 Diagnóstico, Rastreamento e Detecção Precoce

O câncer de ovário apresenta a maioria dos diagnósticos em estádios avançados, uma vez que está associado a sintomas inespecíficos e tardios. Apesar do amplo conhecimento obtido sobre essa patologia nos últimos anos, a taxa de sobrevida não melhorou significativamente devido a alguns desafios em diagnosticá-la e tratá-la o mais precocemente possível. Diferentes modificações em níveis moleculares e genéticos no câncer de ovário são alguns desafios para estabelecer uma plataforma terapêutica (VAFADAR et al., 2020).

Mulheres com sintomas e achados sugestivos de câncer de ovário devem ser avaliadas com exame físico e imaginológico da pelve. Ao identificar-se uma massa anexial, a avaliação para excluir malignidade inclui história clínica, exame físico, estudos de imagem e exames laboratoriais, avaliação dos marcadores tumorais. A abordagem cirúrgica da lesão poderá ser realizada, e o diagnóstico definitivo acontece através do exame histopatológico (INCA, 2022).

Apenas 20% dos casos afetados têm uma detecção precoce do câncer de ovário, pois a maioria só apresenta quadro sugestivo em fases mais avançadas da doença. Os sinais e sintomas mais comuns e que devem ser investigados são: ascite, massa abdominal ou pélvica, distensão abdominal persistente, perda de apetite e peso, dor pélvica ou abdominal, mudança de hábitos intestinais e/ou urinários (INCA, 2022). O câncer de ovário muitas vezes pode ser confundido com outras doenças urológicas, abdominais e ginecológicas, o que colabora para detecções mais tardias. A ausência de ferramentas e/ou testes específicos atrasa ainda mais o diagnóstico. Os biomarcadores são divididos em categorias de diagnóstico, prognóstico, preditivo e de resposta. Porém a baixa sensibilidade e falta de especificidade são os desafios para a maioria dos biomarcadores estudados. Conforme observado anteriormente, a detecção precoce é crucial para aumentar as taxas de sobrevida de pacientes (CHANDRA et al., 2019).

O rastreamento deve ser direcionado a um grupo populacional específico em que o balanço entre benefícios e riscos dessa prática é mais favorável, com maior impacto na redução da mortalidade. Esforços para o desenvolvimento de métodos de triagem eficazes ainda não fornecem uma vantagem de sobrevivência suficiente. Portanto, a exames de rotina em mulheres assintomáticas de risco médio não é recomendada por sociedades médicas. Esta orientação se aplica a mulheres assintomáticas que não apresentem síndrome de câncer hereditário de alto risco (CHARKHCHI et al., 2020; US Task Force, 2021; American Cancer Society, 2022; INCA, 2022).

1.5 TNF, Inflamação e o Microambiente Tumoral

O carcinoma de ovário é de natureza heterogênea. A doença progride através de várias mudanças no nível molecular. A complexidade dessa neoplasia decorre do microambiente afetado por alterações em fatores genéticos e epigenéticos. Compreender o microambiente tumoral é fundamental para o diagnóstico, definição terapêutica individualizada e sobrevida, já que o microambiente varia para diferentes tipos de carcinomas ovarianos (CHANDRA et al., 2019).

O câncer de ovário apresenta alta mortalidade e diagnóstico tardio. A inflamação é um fator de risco para o câncer de ovário, e a resposta inflamatória está envolvida em quase todos os estádios de desenvolvimento do tumor (CHARLES et al., 2009). Estudos epidemiológicos mostram que agentes anti-inflamatórios reduzem a incidência e a mortalidade de diversos tipos de câncer, indicando o potencial papel de fatores pró-inflamatórios na carcinogênese. A expressão de fatores pró-inflamatórios em vários tipos de câncer, incluindo câncer de ovário, foi avaliada em muitos estudos, produzindo resultados consistentes (PLEWKA et al., 2014).

As citocinas são fatores polipeptídicos imunorreguladores autócrinos/parácrinos que participam do processo de várias condições biológicas, incluindo inflamação e carcinogênese (RABINOVICH et al, 2007; 2010). Tais fatores são produzidos por células tumorais, imunes e estromais como fibroblastos e células endoteliais que podem ser capazes de regular a proliferação, sobrevivência, diferenciação, migração e apoptose. As citocinas são encontradas no tecido ovariano normal e associadas à malignidade podendo agir tanto como células antitumorais, quanto como promotoras de tumores (MOH et al, 2021).

As citocinas orquestram a interação promotora de tumores entre as células malignas e o sistema imunológico. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina chave liberada por monócitos e macrófagos. O TNF- α está envolvido em funções biológicas essenciais, como imunorregulação, modulação do crescimento e diferenciação celular (MARTINS FILHO et al., 2014).

A resposta inflamatória está envolvida em quase todos os estádios do desenvolvimento tumoral. O TNF- α é um mediador chave na inflamação, é expresso no microambiente do câncer de ovário e parece promover a progressão tumoral pela indução de citocinas (HANAHAN et al, 2011; KROCKENBERGER et al., 2008). A sua expressão pode variar de acordo com o subtipo de neoplasia ovariana, o que contribui para os fatores diagnósticos e prognósticos (KÖBEL et al, 2008; GILKS et al, 2008). A função imune é comprometida por mediadores da resposta inflamatória sistêmica, que aumenta leucócitos, neutrófilos, plaquetas, proteína C reativa e fibrinogênio e diminui as concentrações de linfócitos (ZHANG et al, 2015). Portanto, a carcinogênese pode resultar de uma falha da resposta imune.

A atuação do TNF ocorre sobre as mesmas células que a produzem (ação autócrina), sobre as células da vizinhança imediata (ação parácrina), ou sistemicamente (ação endócrina). É uma citocina mediadora de resposta inflamatória aguda, e tem essa denominação devido à sua ação inflamatória e trombótica em vasos neoplásicos, resultando em necrose tumoral. Sua

síntese é efetivada por macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares, após estímulo por endotoxinas, imunocomplexos, toxinas, lesões teciduais e/ou inflamação (ROBBINS, COTRAN, 2012; ABBAS, LITCHMAN, PILLAI, 2015).

O TNF- α e seus receptores podem estar implicados na tumorigênese do carcinoma ovariano através de três mecanismos principais de ação: 1) Ao afetar o comportamento/atividade das células do carcinoma ovariano principalmente através do TNFR2 que não ativa as vias apoptóticas, mas pode aumentar a morte celular induzida pelo TNFR1 ou promover a ativação, migração ou proliferação celular através das proteínas quinases ativadas por mitógeno e NF κ B (AL-LAMKI et al, 2005; MUKAI et al, 2009); 2) afetando a morfologia celular. Isso pode permitir que as células neoplásicas se soltem, se mobilizem e se espalhem; 3) regulação de uma rede constitutiva de outras citocinas (IL6), fatores angiogênicos e metaloproteinases que podem atuar de forma autócrina/parácrina para promover a tumorigênese do carcinoma ovariano (PIURA et al, 2014).

A produção ovariana autócrina de TNF- α estimula o crescimento de linhagens celulares de câncer de ovário (KULBE et al, 2007), por meio da sua interação com dois receptores, TNFR1 e TNFR2 (SHIBATA et al, 2010). Logo, os subtipos do receptor de TNF- α podem desempenhar um papel na modulação da resposta imune na carcinogênese ovariana (SWANN et al, 2008). A atividade do TNF- α é mediada principalmente pelo TNFR1. O TNFR2 é expresso nas células imunes infiltrantes/endoteliais e suas funções ainda não são claras, mas provavelmente está envolvido na promoção da proliferação celular (SZLOSAREK et al, 2003; MOCELLIN et al, 2005; AL-LAMKI et al 2005).

As ligações entre inflamação e câncer são cada vez mais reconhecidos; vários mecanismos envolvendo uma série de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e radicais, foram descritos. A via do fator de necrose tumoral (TNF)/receptor de TNF (TNFR)

é conhecida por influenciar a sobrevida de pacientes com câncer (OPALA et al, 2005). Vários estudos já demonstraram isso, como descritos a seguir.

Estudos de *hibridização in situ* correlacionaram a expressão de fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelo epitélio tumoral e infiltração de macrófagos, com aumento do grau tumoral no carcinoma ovariano. Outros mostram que mRNA do TNF- α é expresso pelas células do carcinoma de ovário e podem induzir células do epitélio superficial normal, promovendo crescimento em ambos tipos celulares (SZLOSAREK, KULBE, 2006; KULBE et al., 2011; MEIRA et al., 2019).

Inflamação persistente desencadeada por TNF- α pode predispor a danos ao DNA, angiogênese, invasão, metástases e imunossupressão local. Modelos animais investigando a ligação entre inflamação e tumorigênese têm enfatizado um papel central para TNF- α epitelial tumoral neste processo. Confirmou-se em estudo que o TNF- α é superexpresso no epitélio de tumor ovariano e evidenciou-se uma desregulação na atividade do TNF- α que levou a promoção de microambiente tumoral proinflamatório (SZLOSAREK, KULBE, 2006).

A produção crônica de TNF- α no microambiente tumoral aumenta o recrutamento de células mieloides de forma dependente de IL-17 que contribui para a ação promotora de tumor desta citocina pró-inflamatória (HOLDBROOKS et al., 2018). As concentrações plasmáticas de IL-22 e TNF- α foram significativamente elevadas em pacientes com câncer de ovário em comparação com pacientes controle e neoplasias *borderlines* (WIESER et al., 2019).

Vários estudos têm demonstrado que a associação do TNF- α e seus receptores com prognóstico no câncer de ovário podem ser alvos de novas estratégias de tratamento. A expressão de TNFR2 no microambiente do câncer está associada à progressão do câncer, metástase e evasão imune. Assim, novas estratégias terapêuticas direcionadas ao TNFR2 podem melhorar o manejo de pacientes com câncer de ovário (TORREY et al., 2017; AL-

HATAMLEH et al., 2019). Além disso, os níveis do microambiente tumoral de sTNFR2 (receptor II de TNF solúvel) tiveram uma associação com os graus de diferenciação tumoral 2 e 3 no câncer de ovário (NOMELINI et al., 2018)

O TNFR1 parece ser um fator chave no microambiente tumoral que é dependente da cascata iniciada pelo TNF- α para a tumorigênese (JO E et al, 2020). Foi demonstrado também que tecidos epiteliais de carcinoma ovariano expressam altos níveis de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina (IL)-6, IL-1 α e IL-1 β . . Os níveis de mRNA de TNF- α e mRNA de TNFR2 foram significativamente maiores em tecidos de carcinoma ovariano do que em tecidos ovarianos normais, enquanto os níveis de mRNA de TNFR1 foram semelhantes. TNFR1 e TNFR2 foram localizados principalmente nas células neoplásicas epiteliais do tumor. O estudo indica um possível papel do TNF- α na patogênese do carcinoma epitelial de ovário através do TNFR2, que afeta alterações morfológicas, que podem estar envolvidas no câncer de ovário (JAMMAL et al., 2015).

O receptor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2) é expresso em algumas células tumorais, como mieloma, linfoma de Hodgkin, câncer de cólon e câncer de ovário, além de células imunossupressoras. Níveis de microambiente tumoral de sTNFR2 podem representar um fator de mau prognóstico no câncer de ovário epitelial (YANG et al., 2015).

Embora a nanomedicina tenha sido extensivamente estudada como portadora de agentes imunoterapêuticos contra o câncer, nenhum estudo até o momento foi direcionado ao TNFR2 no tratamento do câncer. De uma perspectiva epigenética, estudos anteriores indicam que a desmetilação do DNA pode ser responsável por altas expressões de TNFR2 em modelos de câncer. Essa abordagem pode maximizar o potencial anticancerígeno da imunoterapia baseada em nanomedicina e, conseqüentemente, melhorar significativamente os resultados do manejo de pacientes com malignidade (NOMELINI et al., 2018).

A ativação do receptor de morte do receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) pelo TNF induz a sobrevivência celular ou a morte celular. No entanto, os mecanismos que mediam esses resultados distintos permanecem pouco compreendidos. Essas descobertas coletivas apontam para um novo mecanismo dependente de glicosilação que regula a resposta celular ao TNF e pode promover a sobrevivência de células cancerígenas em microambientes tumorais ricos em TNF (NEGUS et al., 1998). Os resultados de estudo sugerem que a expressão tecidual de TNFR2 em câncer de ovário epitelial esteja correlacionada com o maior risco de progressão do câncer. Assim, o valor clínico do sistema TNF ativado no câncer de ovário epitelial precisa ser mais investigado (LI et al., 2019).

O melhor entendimento da regulação do TNF- α possibilitará terapêuticas mais eficazes, tendo como alvo a expressão do mesmo (SZLOSAREK, KULBE, 2006).

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

O câncer de ovário apresenta como característica geral o diagnóstico tardio, e consequentemente, maior letalidade. Apesar de muitos estudos, pouco se evoluiu em termos de redução de morbimortalidade, terapêuticas e melhora de sobrevida a essa doença. A avaliação do microambiente tumoral proporcionou descobertas a respeito das formas de ação do TNF e seus receptores. Ao serem dosados, servirão para melhor entendimento da carcinogênese e prognóstico, e até mesmo melhor e mais individualizada programação terapêutica.

HIPÓTESE

HIPÓTESE NULA

Não há diferenças na imunomarcção de TNF e seus receptores em lesões não neoplásicas, benignas e malignas.

HIPÓTESE ALTERNATIVA

A imunomarcção estromal forte de TNF, TNFR1 e TNFR2 é mais encontrada em neoplasias malignas de ovário, em comparação com neoplasias benignas e lesões não neoplásicas de ovário, e há associação de imunomarcção forte de TNFR2 com fatores de pior prognóstico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Gerais

Avaliar a imunomarcção estromal de TNF- α e seus receptores em lesões não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas de ovário.

Específicos

Comparar a imunomarcção de TNF- α e seus receptores: receptor tipo 1 (TNF-1R1) e receptor tipo 2 (TNFR2) no estroma peritumoral de lesões não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas de ovário.

Relacionar a imunomarcção estromal de TNF- α e seus receptores: receptor tipo 1 (TNFR1) e receptor tipo 2 (TNFR2) de pacientes com neoplasia maligna de ovário com fatores prognósticos clínicos (idade, paridade, história de terapia hormonal, menacme e menopausa), laboratoriais (relação neutrófilo-linfócito, relação plaqueta-linfócito, glicemia de jejum, marcadores tumorais) e patológicos (estadiamento, tipo de carcinogênese e grau de diferenciação).

Avaliar a sobrevida livre de progressão e sobrevida global em pacientes com neoplasia maligna de ovário, de acordo com os valores de TNF- α e seus receptores.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES

Trata-se de um Estudo de Coorte, envolvendo pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM entre os anos 1997 a 2020 que apresentaram indicação de tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos (MURTA et al., 2004; MURTA & NOMELINI, 2006) fizeram parte desse estudo. Foram revisados os resultados anátomo-patológicos em parafina, sendo então incluídas no estudo as pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia maligna epitelial de ovário (n=43), neoplasia benigna de ovário (n=37), e lesões não neoplásicas de ovário (n=15). Os casos *borderline* foram incluídos no grupo de neoplasias malignas. Foi realizado imunohistoquímica para TNF- α e seus receptores 1 e 2, conforme detalhado a seguir.

Consentimento foi obtido de cada paciente incluída no estudo. O estudo foi aprovado pelo CEP, parecer: 34770014.4.0000.5154.

Crêterios de Indica o de Laparotomia Exploradora

Os critérios de indica o de cirurgia foram: cistos anecoicos com diâmetro máximo menor que 7 cm, com persistência da altera o por mais que 6 meses e marcadores tumorais normais; pelo menos um marcador tumoral alterado; cistos anecoicos com diâmetro máximo maior ou igual a 7cm; massas ovarianas com conteúdo sólido, presença de vegeta o intrac stica, septos grossos, 2 ou mais septos finos; bilateralidade; presença de ascite; color Doppler com  ndice de resistência menor ou igual a 0,4 (MURTA et al., 2004; MURTA & NOMELINI, 2006).

Critério de Inclusão

O critério de inclusão foi diagnóstico de neoplasia maligna primária de ovário, ou neoplasia benigna de ovário, ou lesão não neoplásica de ovário, confirmados pelo anátomo-patológico em parafina.

Crítérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram torção do pedículo anexial, neoplasia maligna secundária de ovário (metástase), tratamento antineoplásico prévio, doenças imunossupressoras e recidiva.

Variáveis Analisadas

Os seguintes dados dos prontuários foram anotados em banco de dados específico para o estudo: idade, paridade, história de terapia hormonal, idade da menarca, idade da menopausa, tipo histológico, grau histológico, estadiamento (FIGO), metástases em linfonodos, classificação em tipo I e tipo II de câncer de ovário, sobrevida livre de progressão (período entre a data da cirurgia até a data da primeira recidiva) e sobrevida global (período entre a data da cirurgia até o óbito por qualquer causa) (foram expressas em meses), e os resultados dos experimentos.

Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado a partir da amostragem aleatória simples e calculado pela fórmula $n = \frac{z(1-\gamma)/2p}{d}^2$. Considerou-se erro absoluto tolerável de 5% (d) e confiabilidade e precisão da amostra de 95%. Com estes parâmetros obteve-se o número total de 93 pacientes.

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

MÉTODOS

Estudo anátomo-patológico

Foi realizado pelo Serviço de Patologia Cirúrgica da UFTM nos cortes embebidos em parafina, sendo que os casos foram revisados por um observador da Serviço de Patologia Cirúrgica, para a escolha dos melhores cortes para a realização de estudo imunohistoquímico. A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram realizados de acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* – FIGO (ZEPERNICK, MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

Imunohistoquímica

Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica foram processados em parafina e revisados por patologista experiente. Os casos selecionados foram submetidos a novos cortes (4µm) em lâminas silanizadas (ATPS - Silano, Sigma® A3648), empregando-se o Sistema de detecção de Polímeros Novolink™. As lâminas permaneceram em estufa a uma temperatura de 56°C por um período de 24h, e em seguida foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol,

permanecendo 5 minutos em cada banho e desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%, 10 segundos cada banho. Posteriormente, após as lâminas permanecerem em banho de solução salina tamponada, o PBS (pH 7.2) durante 5 minutos, para hidratação. Logo depois foi realizada a recuperação dos antígenos. As lâminas foram colocadas em tubos de citologia contendo solução tampão Tris-EDTA, 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 à temperatura ambiente de 22°C.

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

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem. Em seguida as lâminas foram incubadas com Bloqueador de Proteínas por 15 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem e incubadas com anticorpo primário diluído em BSA, (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), por cerca de 18 horas, em câmara úmida, a 4 °C.

Foram utilizados controles positivos para cada anticorpo, mediante pré-requisitos do fabricante. Após a incubação overnight a 4 °C com os anticorpos específicos anti-TNF, anti-TNFR1 e anti-TNFR2, as lâminas foram colocadas à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e foram novamente lavadas com tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem e

secas. Os anticorpos primários utilizados no trabalho, diluições e controles estão descritos no Anexo C. As lâminas então, foram incubadas com Anticorpo pós-primário durante 30 minutos. Foram lavadas com tampão PBS durante 5 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com Polímero Novolink™ durante 30 minutos. Foram lavadas com tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem. Após lavagem com PBS, as lâminas foram reveladas através da adição da solução cromógena (Diaminobenzidine - DAB), por 5 minutos. Após, 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 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.

Foram utilizados controles positivo e negativo. Dois observadores avaliaram as lâminas, e a concordância interobservador foi calculada pelo kappa (ARANGO, 2001). A intensidade de imunomarcção no estroma peritumoral foi avaliada subjetivamente utilizando-se 0 a 3 (GEORGIANNOS et al., 2003): 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada), 3 (marcação forte). No estudo imunohistoquímico, a concordância entre os dois 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. Todos os casos discordantes foram reavaliados e o resultado foi definido por consenso.

Segue, a seguir, imagens de colorações de imuno-histoquímica. São cortes histológicos de lesões ovarianas estudadas.

Figura 1 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α em Adenocarcinoma Seroso Borderline (100x).

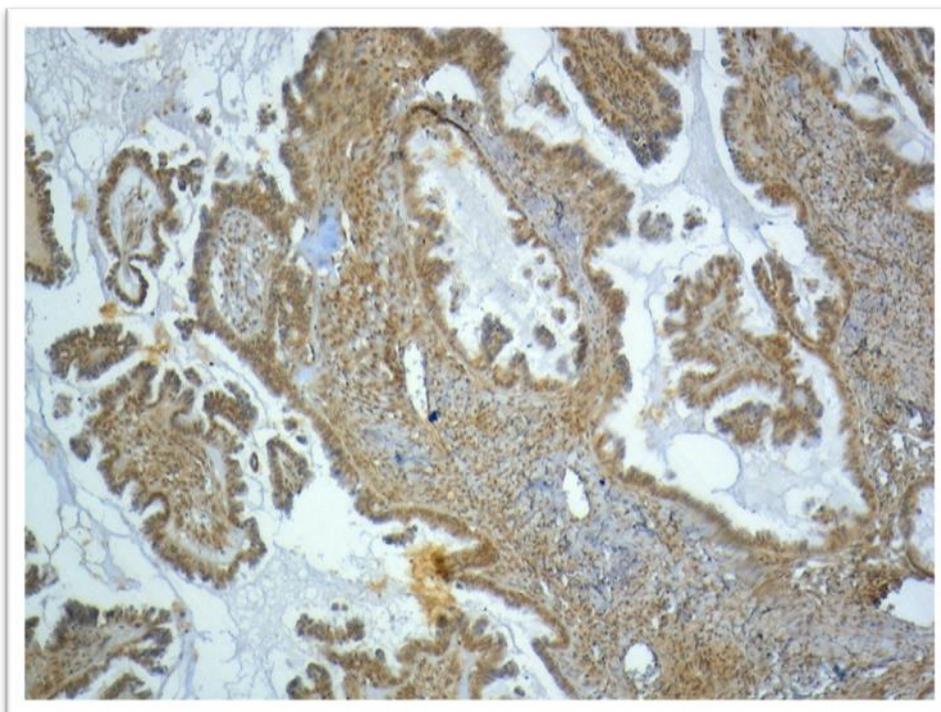


Figura 2 - Imunomarcção estromal (0-1) de TNF- α em tumor não neoplásico (100x).

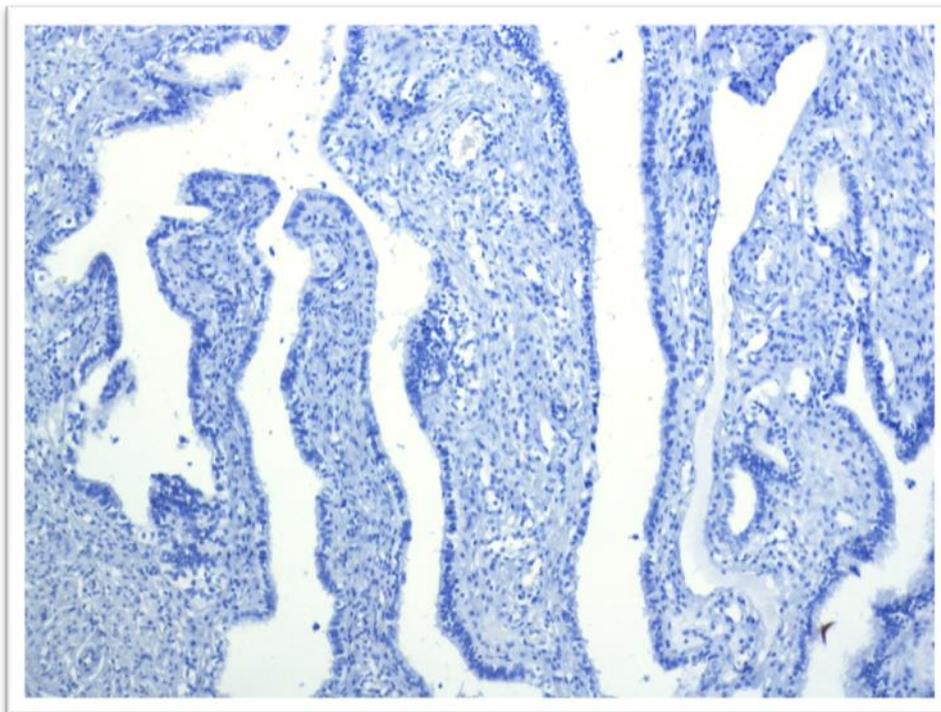


Figura 3 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α R1 em Adenocarcinoma Seroso Borderline (100x).

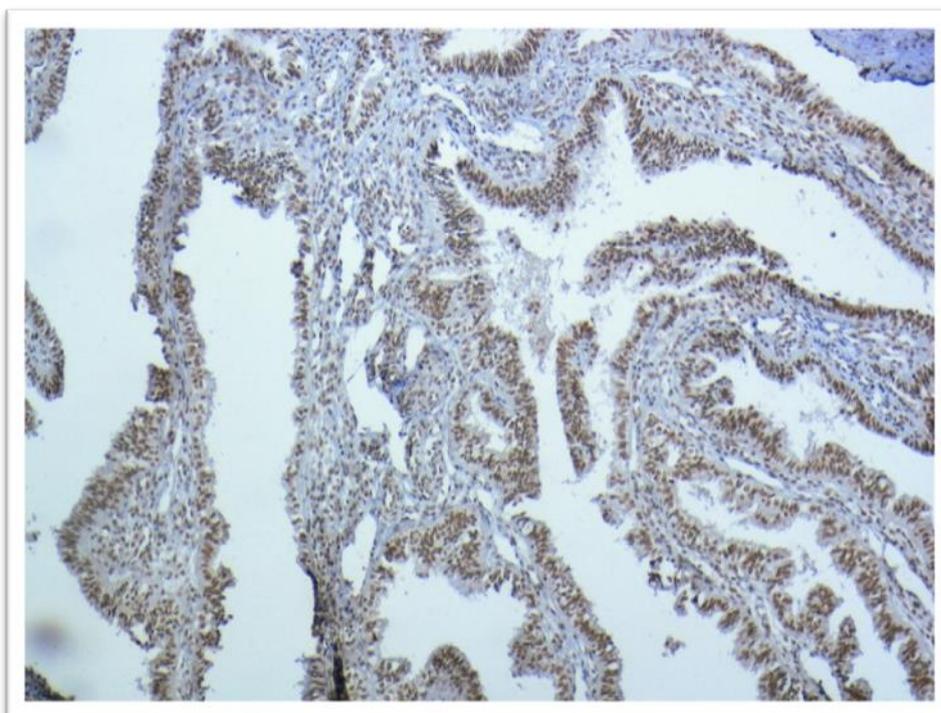


Figura 4 - Imunomarcção estromal (0-1) de TNF- α R1 em Cistadenoma Seroso (100x).

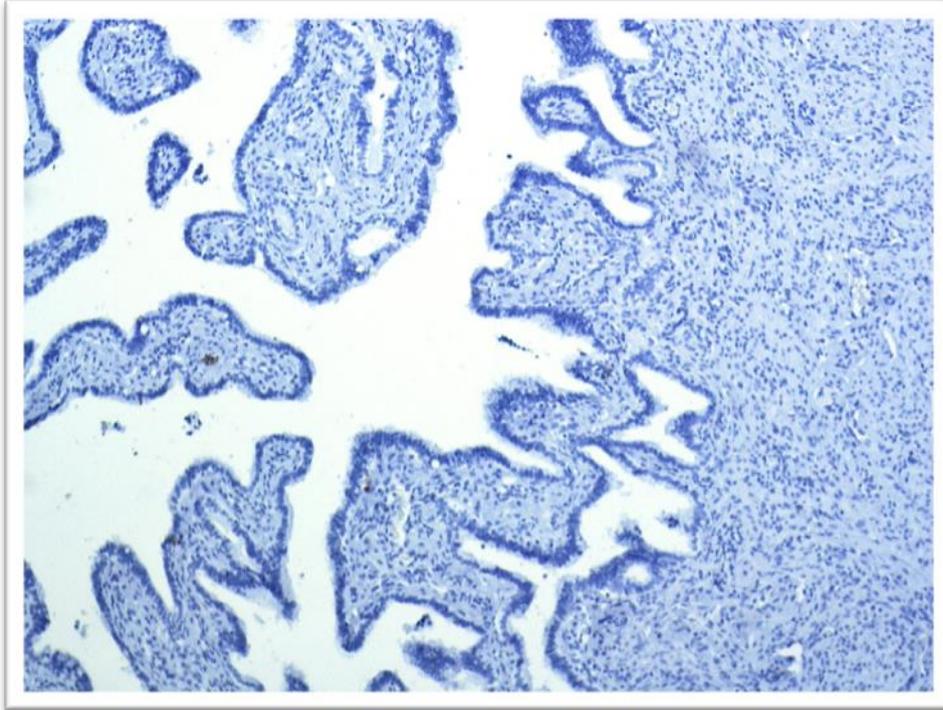


Figura 5 – Imunomarcção estromal (2-3) de TNF- α R2 em Adenocarcinoma Seroso Borderline (100x).

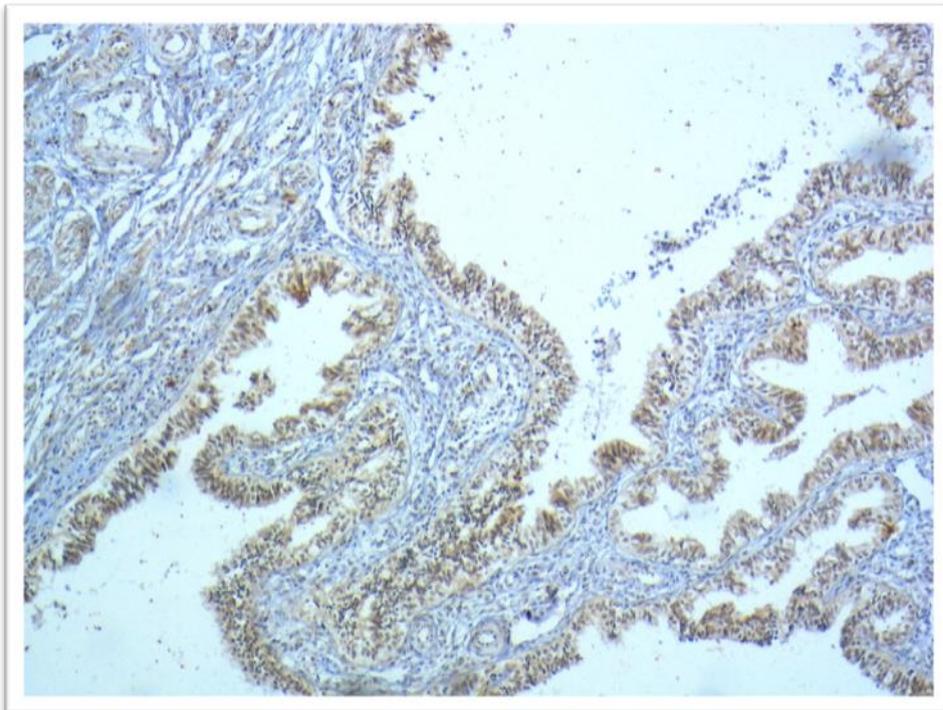
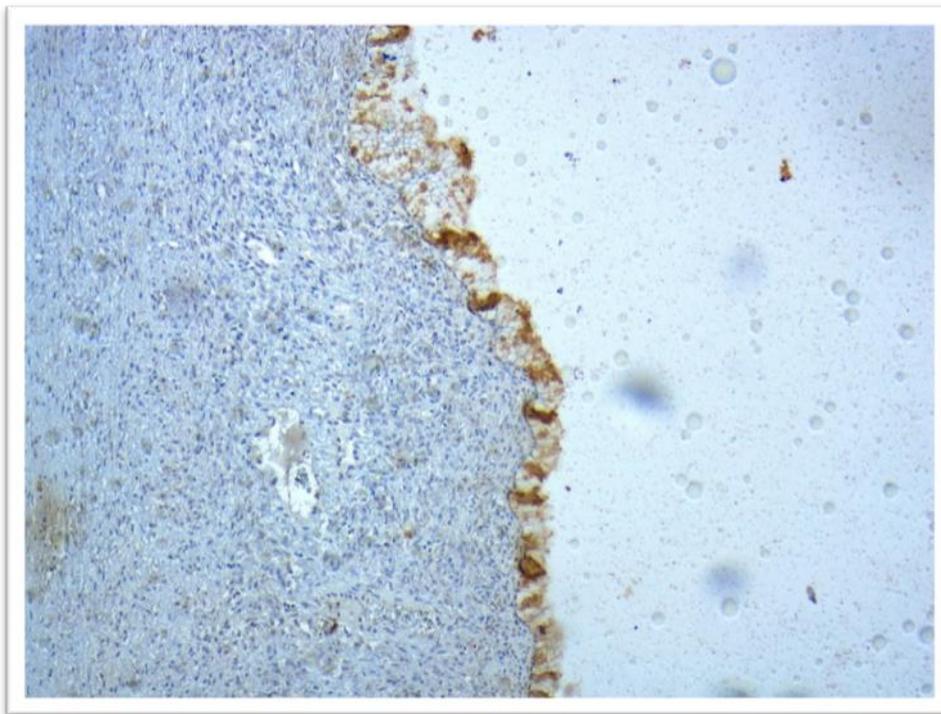


Figura 6 - Imunomarcaco estromal (2-3) de TNF- α R2 em Cistadenoma Mucinoso (100x).



Avaliao do hemograma e marcadores tumorais

O hemograma e marcadores tumorais foram coletados no pr-operatório. Os parâmetros do hemograma avaliados foram hemoglobina, valor absoluto de neutrófilos, neutrófilos em banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas. Os valores de RDW, razão neutrófilo-linfócito (NLR) e razão plaqueta-linfócito (PLR) também foram avaliados. A NLR foi calculada dividindo-se o número absoluto de neutrófilos pelo número absoluto de linfócitos. O PLR foi calculado dividindo-se o número absoluto de plaquetas pelo número absoluto de linfócitos. Os marcadores tumorais avaliados foram CA-125, CA 15.3 e CA19.9.

Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 6, MedCalc 19.0.4 e IBM SPSS Statistics 20. A avaliação dos fatores prognósticos nos casos malignos e a comparação entre tumores não neoplásicos, neoplasias benignas e malignas foi realizada pelo teste exato de Fisher. A avaliação da sobrevida global e livre de doença foi realizada através de curvas de Kaplan-Meier e log-rank. Os valores de marcadores tumorais e parâmetros de hemograma foram comparados entre os grupos de imunomarcção fraco (0/1) e forte (2/3) por Mann -Teste de Whitney. Para os parâmetros que foram estatisticamente significativos, uma curva ROC foi usada para obter a área sob a curva (AUC) e para determinar os melhores valores de corte entre a imunomarcção fraca (0/1) e forte (2/3). Para os dados com significância estatística nessa análise, foi realizada análise multivariada. O nível de significância foi inferior a 0,05.

Redação do texto

O texto desse trabalho foi redigido conforme as normas técnicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2021).

RESULTADOS

RESULTADOS

Foram inseridas neste trabalho 95 pacientes distribuídas em 3 grupos (37 neoplasias benignas, 43 neoplasias malignas e 15 lesões não neoplásicas).

No grupo de neoplasias malignas, a mediana de idade foi de 56 anos (17-81 anos), a paridade mediana foi de 2 partos (0-12 partos), a idade mediana de menarca foi 13 anos (10-16 anos), a idade mediana da menopausa foi 49 anos (33-57 anos). Foram a óbito 17 pacientes (39,5%) deste grupo.

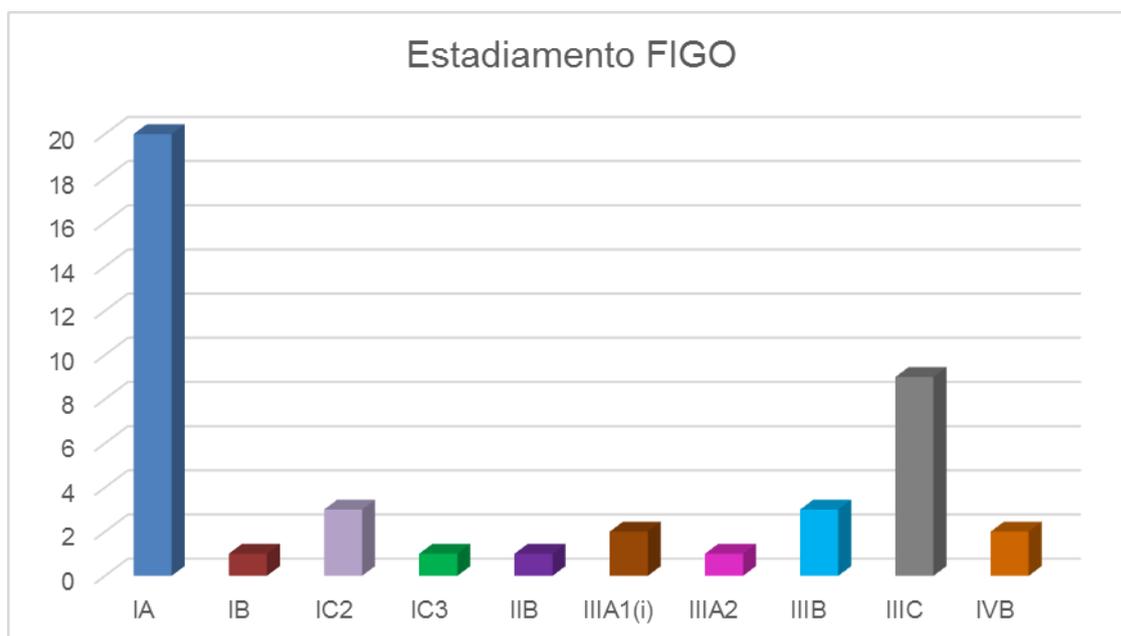
No grupo de neoplasias benignas, a mediana de idade foi de 48 anos (18-69 anos), a paridade mediana foi de 2 partos (0-7 partos), a idade mediana de menarca foi 13 anos (11-17 anos), a idade mediana da menopausa foi 49 anos (29-55 anos).

No grupo de lesões não neoplásicas, a mediana de idade foi de 46 anos (35-82 anos), a paridade mediana foi de 2 partos (0-5 partos), a idade mediana de menarca foi 13 anos (11-15 anos), a idade mediana da menopausa foi 47 anos (38-50 anos).

Segundo a *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), os estadiamentos das neoplasias malignas foram: IA com 20 (46,5%) pacientes, IB com 1 (2,3%) paciente, IC2 com 3 (7,0%) pacientes, IC3 com 1 (2,3%) paciente, IIB com 1 (2,3%) paciente, IIIA1(i) com 2 (4,7%) pacientes, IIIA2 com 1 (2,3%) paciente, IIIB com 3 (7,0%) pacientes, IIIC com 9 (27,9%) pacientes e IVB com 2 (4,7%) pacientes (Figura 7).

Figura 7: Frequência do estadiamento das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997

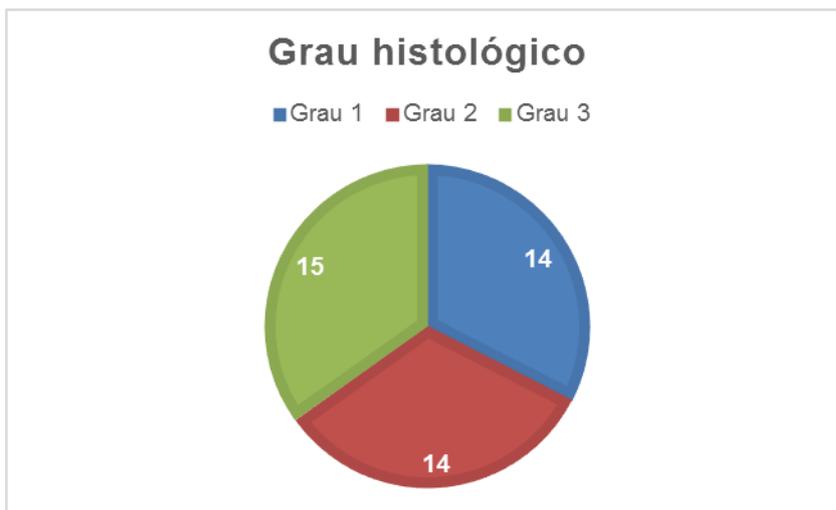
a 2020, segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.



Fonte: O Autor.

Em relação ao grau de diferenciação histológica dos tumores malignos, 14 pacientes (32,6%) obtiveram grau 1, 14 pacientes (32,6%) obtiveram grau 2 e 15 (34,9%) pacientes obtiveram grau 3.

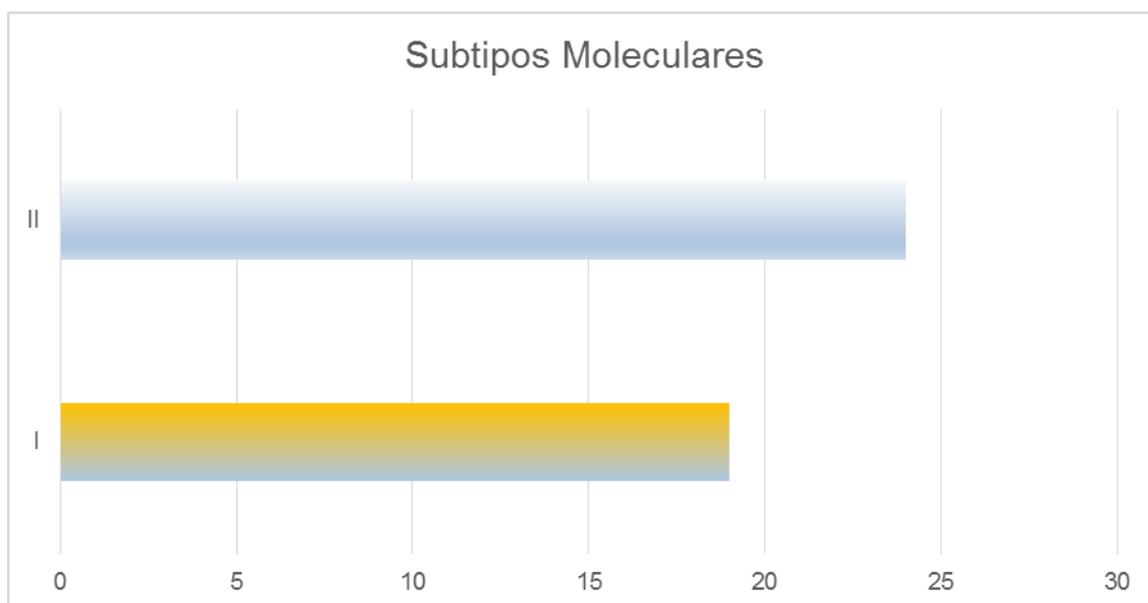
Figura 8 – Frequência do Grau Histológico das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020, segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.



Fonte: O Autor.

Os subtipos moleculares das neoplasias malignas foram: tipo I 19 pacientes (44,2%) e tipo II 24 (55,8%) pacientes.

Figura 9: Frequência do Subtipo Molecular das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020, segundo os critérios da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO/2016.



Fonte: O Autor.

A classificação histológica das pacientes com Neoplasias Benignas está listada na tabela 3, assim como a classificação histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de ovário descritas na tabela 4 e das pacientes com lesões não neoplásicas descritas na tabela 5.

Tabela 3: Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Benignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

Diagnóstico Histológico	n	%
-------------------------	---	---

Cistoadenoma Mucinoso	17	46
Cistoadenoma Seroso	20	54

Fonte: O Autor.

Tabela 4: Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

Diagnóstico Histológico das Neoplasias Malignas	n	%
Adenocarcinoma Endometrióide	1	2,3
Adenocarcinoma de Células Claras	1	2,3
Tumor de células de Sertoli-Leydig / tumor dos cordões sexuais	1	2,3

Tumor Endometrióide <i>Borderline</i>	1	2,3
Cistadenocarcinoma Mucinoso	3	7,0
Tumor de Células da Granulosa	3	7,0
Tumor Seroso <i>Borderline</i>	4	9,3
Adenocarcinoma indiferenciado	5	11,6
Tumor Mucinoso <i>Borderline</i>	8	18,6
Cistadenocarcinoma Seroso	16	37,2

Fonte: O Autor.

Tabela 5: Classificação Histológica das pacientes com Lesões não neoplásicas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

Diagnóstico Histológico das Lesões não neoplásicas	n	%
Cisto de Inclusão	1	6,7
Corpo Lúteo Hemorrágico	2	13,3
Cisto Folicular	3	20,0
Cisto Teca Luteínico	4	26,7
Cisto Simples	5	33,3

Fonte: O Autor.

A Tabela 6 demonstra as diferenças na marcação tecidual estromal por imunohistoquímica das citocinas entre neoplasias malignas, benignas e lesões não neoplásicas de ovário.

Houve maior imunomarcção de TNF R1 em neoplasias malignas comparando-se às neoplasias benignas, maior imunomarcção de TNF R2 em neoplasias malignas comparando-se às neoplasias benignas, maior imunomarcção de TNF em neoplasias benignas comparando-se com os lesões não neoplásicas, menor imunomarcção de TNF R1 em neoplasias benignas comparando-se com os lesões não neoplásicas, maior imuno-marcção de TNF e TNF R2 em neoplasias malignas comparando-se com os lesões não neoplásicas.

Tabela 6: Diferenças na marcação tecidual estromal por imunohistoquímica das citocinas entre neoplasias malignas, benignas e lesões não neoplásicas de ovário das pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997 a 2020.

		0/1	2/3	p
TNF Estromal (n=37/43)	Neoplasias Benignas	11 (29,7%)	26 (70,3%)	0,2969
	Neoplasias Malignas	8 (18,6%)	35 (81,4%)	
TNFR1 Estromal (n=37/43)	Neoplasias Benignas	37 (100,0%)	0 (0%)	< 0.0001*
	Neoplasias Malignas	17 (39,5%)	26 (60,5%)	
TNFR2 Estromal (n=37/43)	Neoplasias Benignas	30 (81,1%)	7 (18,9%)	0,0091*
	Neoplasias Malignas	22 (51,2%)	21 (48,8%)	
TNF Estromal (n=37/15)	Neoplasias Benignas	11 (29,7%)	26 (70,3%)	0,0016*
	Lesões não neoplásicas	12 (80,0%)	3 (20,0%)	

TNFR1 Estromal	Neoplasias Benignas	37(100,0%)	0 (0%)	0,0002*
(n=37/15)	Lesões não neoplásicas	9 (60,0%)	6 (40,0%)	
TNFR2 Estromal	Neoplasias Benignas	30 (81,1%)	7 (18,9%)	0,0933
(n=37/15)	Lesões não neoplásicas	15 (100,0%)	0 (0%)	
TNF Estromal	Neoplasias Malignas	8 (18,6%)	35 (81,4%)	< 0.0001*
(n=43/15)	Lesões não neoplásicas	12 (80,0%)	3 (20,0%)	
TNFR1 Estromal	Neoplasias Malignas	17 (39,5%)	26 (60,5%)	0,231
(n=43/15)	Lesões não neoplásicas	9 (60,0%)	6 (40,0%)	
TNFR2 Estromal	Neoplasias Malignas	22 (51,2%)	21(48,8%)	0,0004*
(n=43/15)	Lesões não neoplásicas	15 (100,0%)	0 (0%)	

* Teste Exato de Fisher, com nível de significância de $p < 0,005$. **0/1**: Imunomarcção Fraca. **2/3**: Imunomarcção Forte. Fonte: O Autor.

A tabela 7 mostra a relação entre a marcação tecidual estromal dos imunomarcadores estudados e fatores prognósticos patológicos, clínicos e laboratoriais em neoplasias malignas de ovário.

Foi possível verificar associação entre glicemia ≤ 100 e forte marcação imunohistoquímica de TNF ($p=0,0091$). Não houve diferença significativa em relação aos demais imunomarcadores estudados com os fatores prognósticos patológicos, clínicos e laboratoriais avaliados.

Tabela 7: Relação da marcação tecidual estromal por imunohistoquímica das citocinas e fatores prognósticos patológicos, clínicos e laboratoriais em neoplasias malignas de ovário.

		TNF 0,1	TNF 2,3	TNFR1 0,1	TNFR1 2,3	TNFR2 0,1	TNFR2 2,3
Grau Histológico (n=43)	1	1(7,1%)	13(92,9%)	6(42,9%)	8(57,1%)	6(42,9%)	8(57,1%)
	2/3	7(24,1%)	22 (31,9%)	11(37,9%)	18(62,1%)	16(55,2%)	13(44,8%)
Estadiamento (FIGO) (n=43)	I/II	4(15,4%)	22(84,6%)	8(30,8%)	18(69,2%)	12(46,2%)	14(53,8%)
	III/IV	4(23,5%)	13(76,5%)	9(50%)	9(50%)	10(58,8%)	7 (41,2%)
Subtipo Molecular (n= 43)	I	3(15,8%)	16(84,2%)	9(47,4%)	10(52,6%)	8(42,1%)	11(57,9%)
	II	5(20,8%)	19(79,2%)	8(33,3%)	16(66,7%)	14(58,3%)	10(41,7%)
Metástases em Linfonodos (n=37)	Positiva	4(40%)	6(60%)	5(50%)	5(50%)	7(70%)	3(30%)
	Negativa	4(14,8%)	23(85,2%)	9(33,3%)	18(66,7%)	13(48,1%)	14(51,9%)
Hemoglobina ≥ 12 (n=43)	≥12	5(15,6%)	27 (84,4%)	11(34,4%)	21(65,6%)	15(46,9%)	17(53,1%)
	<12	3(27,3%)	8 (72,7%)	6 (54,5%)	5/(45,5%)	7 (63,6%)	4(36,4%)

Glicemia (mg/dL) (n=43)	≤100	2(6,9%)	27(93,1%)*	11(37,9)	18(62,1%)	14(48,3%)	15(51,7%)
	>100	6(42,9%)	8 (57,1%)	6(42,9%)	8(57,1%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)
Resposta à Quimioterapia (n=19)	Completa	1(10%)	9(90%)	6 (60%)	4(40%)	5(50%)	5(50%)
	Parcial	3(33,3%)	6(66,7%)	2(22,2%)	7(77,8%)	6(66,7%)	3(33,3%)
Sobrevida Livre da Doença (n=43)	≥ 36 meses	2(25%)	6(75%)	8(61,5%)	5(38,5%)	8(61,5%)	5(38,5%)
	< 36 meses	8(22,9%)	27(77,1%)	9(30%)	21(70%)	14(46,7%)	16(53,3%)

* $p=0,0091$, comparando a Glicemia $\leq 100 / > 100$ (Teste Exato de Fisher $p < 0,05$). Fonte: O autor.

Nas análises de sobrevida livre de doença e sobrevida global, não houve diferenças entre imunomarcção fraca e forte de TNF- α , TNFR1 e TNFR2 (figuras 10-16).

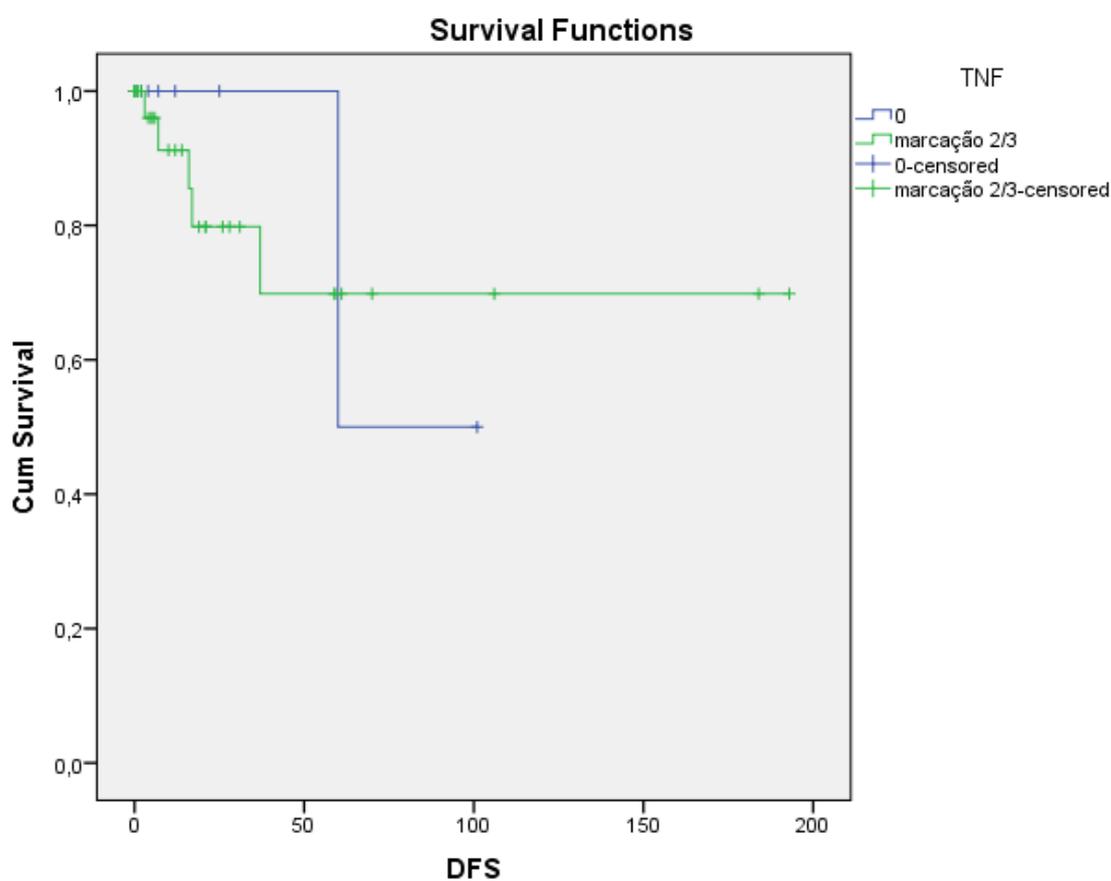


Figura 10 - Sobrevida livre de doença em imunomarcção fraca e forte de TNF- α (p=0.835).

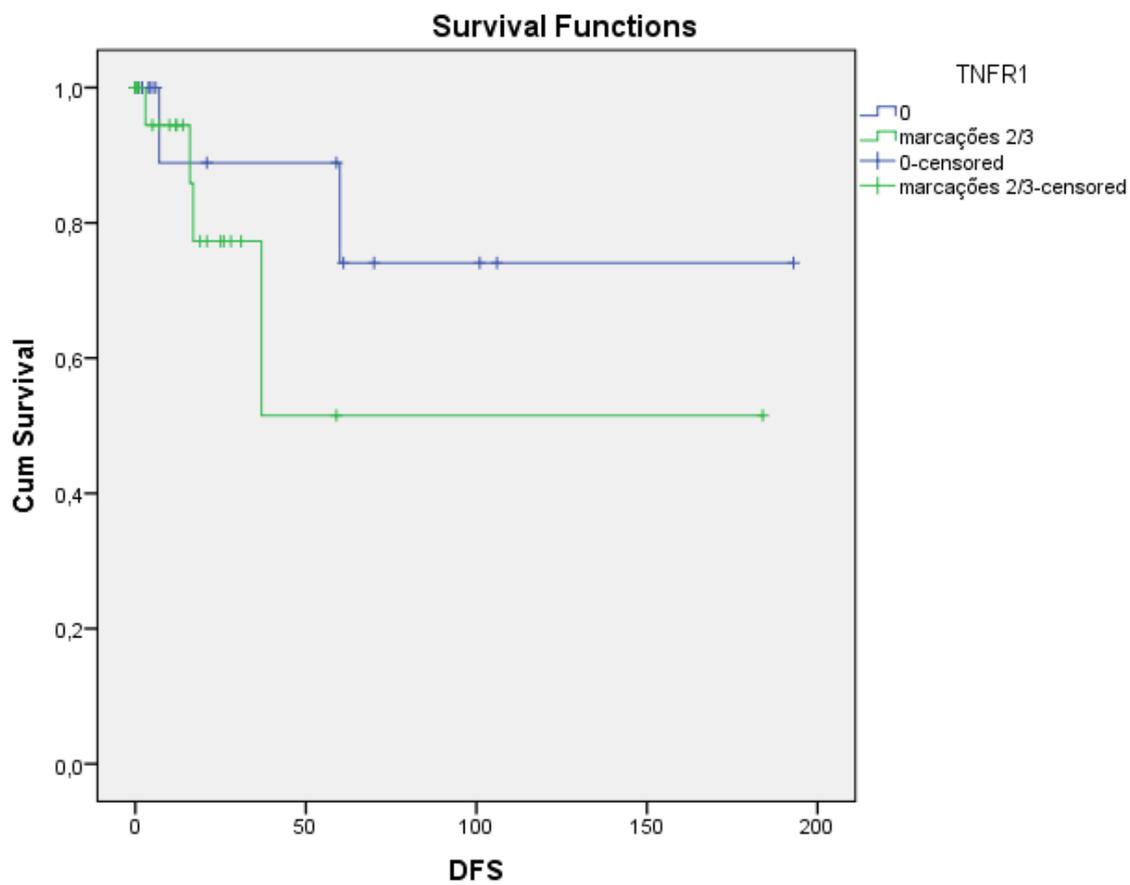


Figura 11 – Sobrevida livre de doença em imunomarcção fraca e forte de TNFR1 (p=0,291).

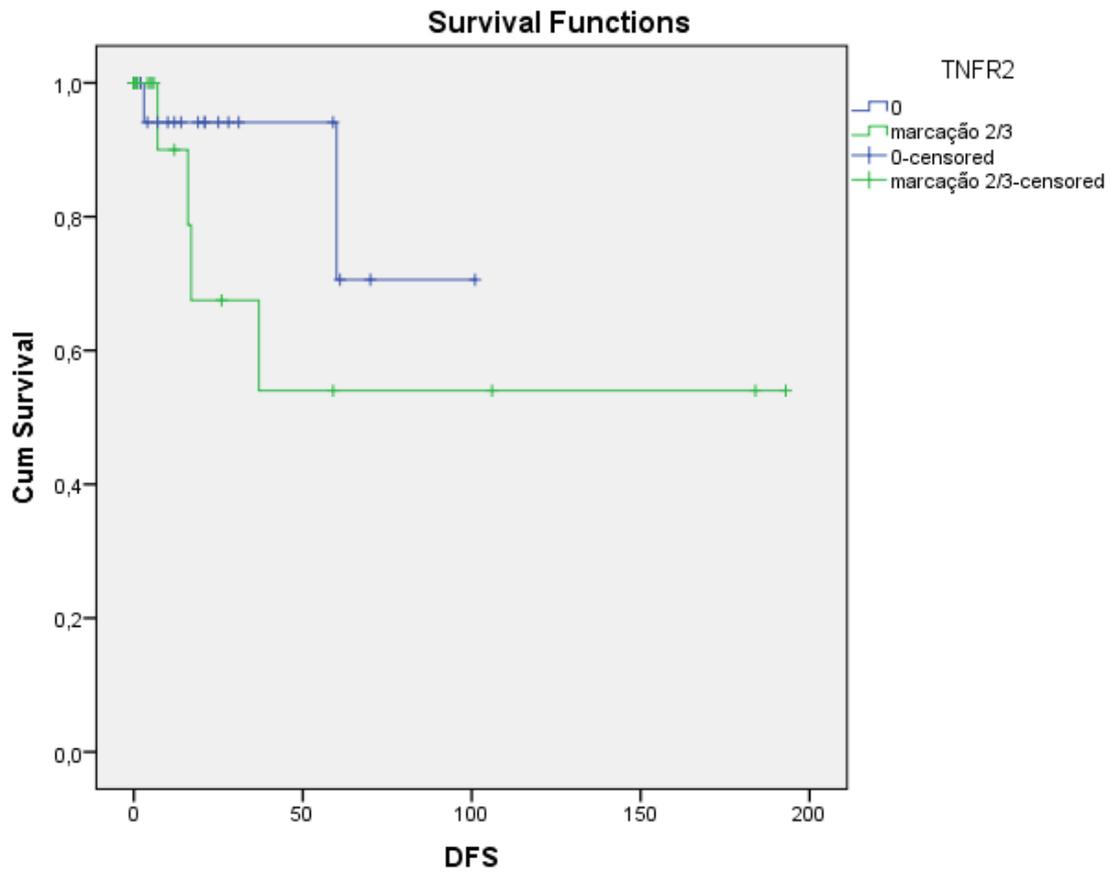


Figura 12 – Sobrevida livre de doença em imunomarcação fraca e forte de TNFR2 (p=0,244).

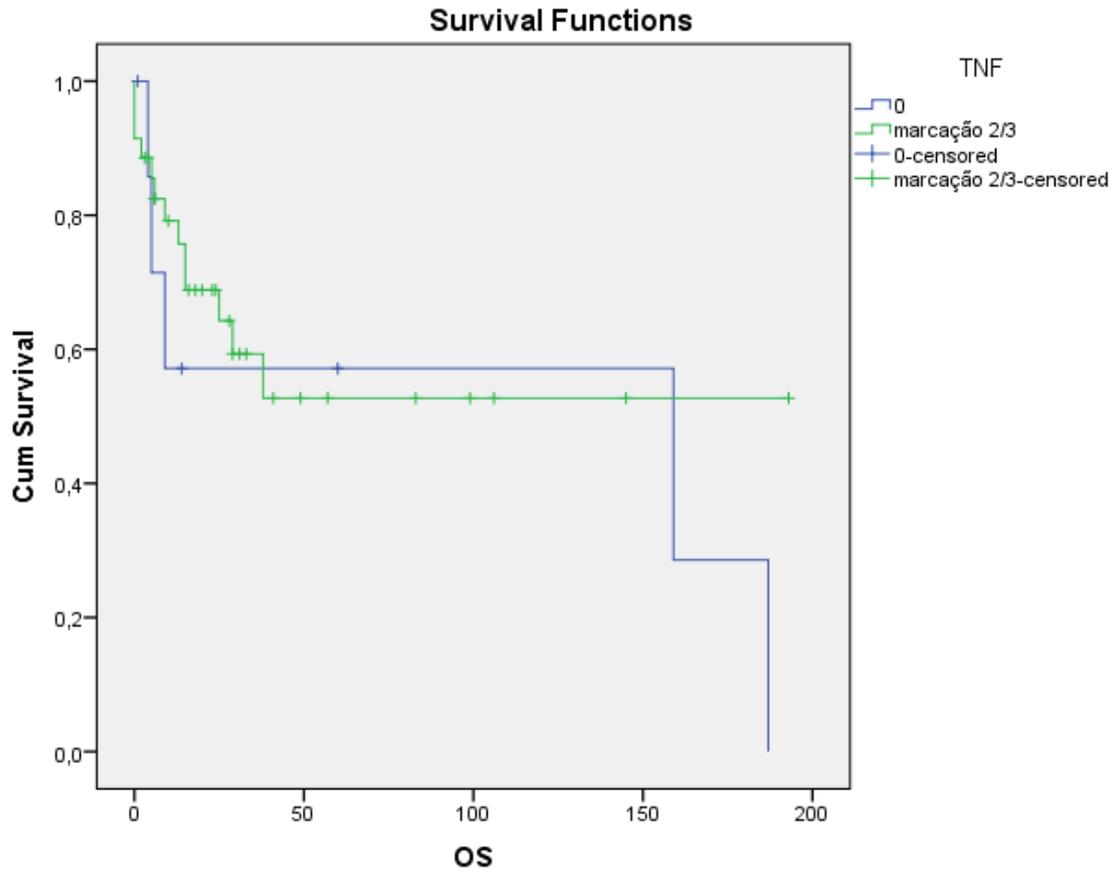


Figura 13 – Sobrevida global em imunomarcção fraca e forte de TNF- α ($p=0,507$).

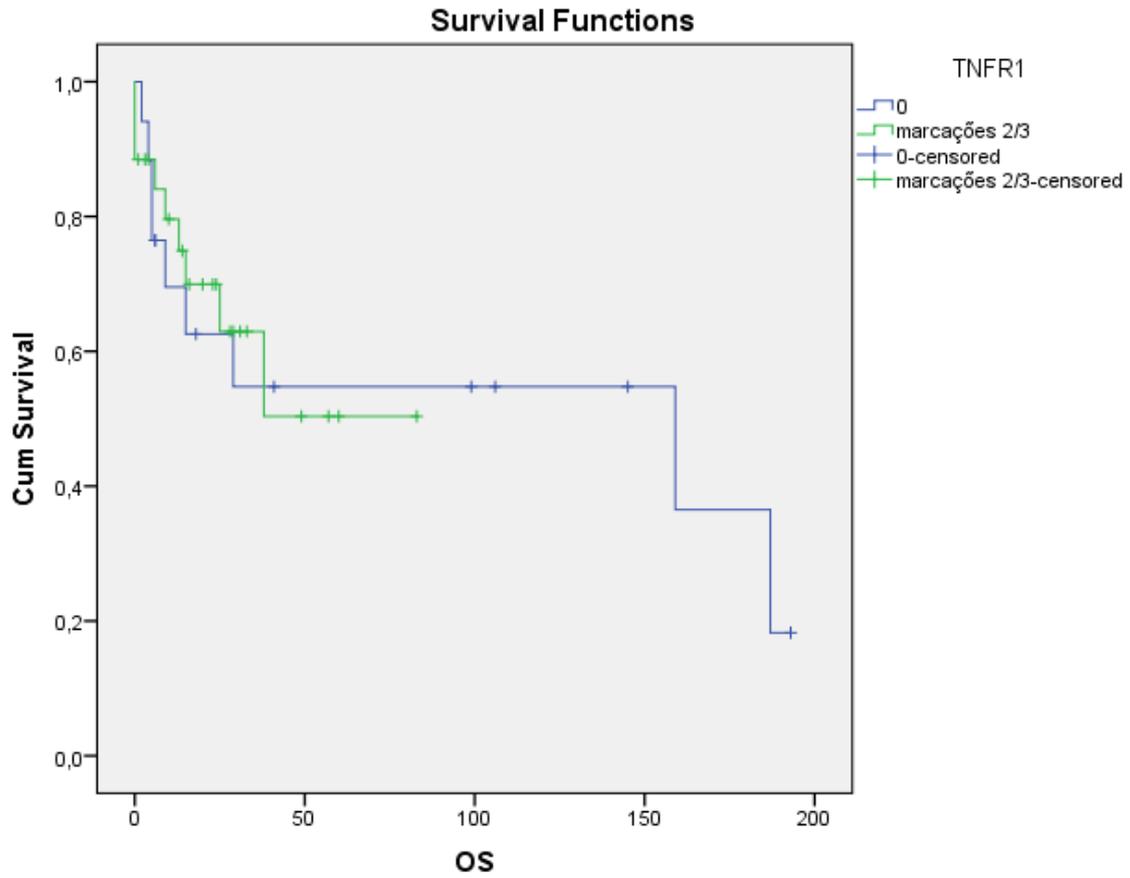


Figura 14 – Sobrevida global em imunomarcaco fraca e forte de TNFR1 ($p=0,892$).

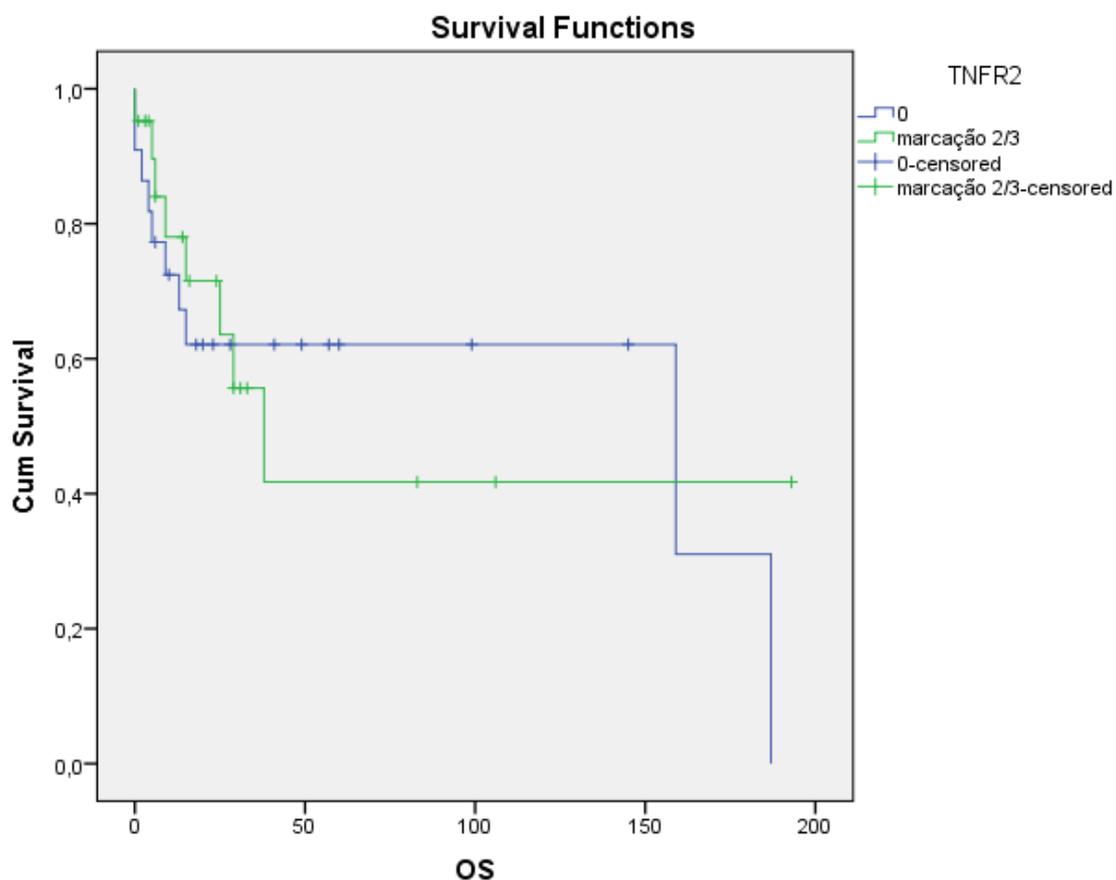


Figura 15 – Sobrevida global em imunomarcção fraca e forte de TNFR2 ($p=0,834$).

Em relação à associação da imunomarcção com parâmetros do hemograma e marcadores tumorais, os resultados estão descritos a seguir. Para TNF- α , analisando as curvas ROC, houve significância estatística para basófilos (valor de corte > 0 ; sensibilidade = 14,3%; especificidade = 100%; AUC = 0,571; $p = 0,017$) e neutrófilos (valor de corte ≤ 3900 ; sensibilidade = 54,3; especificidade = 100%; AUC = 0,663; $p = 0,04$) entre imunomarcção forte (2/3) e fraca (0/1). Em relação ao TNFR1, pela curva ROC, foi encontrado um valor de corte de monócitos $> 312/\text{mm}^3$ entre imunomarcção forte (2/3) e fraca (0/1), com sensibilidade de 92,3% e especificidade de 47 . 1% e AUC

= 0,708 (p=0,013). Em relação ao TNFR2, o valor de corte de CA-125 foi $\leq 95,16$ U/ml entre imunomarcção forte (2/3) e fraca (0/1), com sensibilidade de 89,5% e especificidade de 52,4% e AUC = 0,704 (p=0,017). Ainda em relação ao TNFR2, o valor de corte para o número absoluto de plaquetas foi $\leq 298.000/mm^3$ entre imunomarcção forte e fraca, com sensibilidade de 81% e especificidade de 54,5% e AUC = 0,672 (p=0,04) (**Figura 16**). Não houve significância estatística com os demais parâmetros do hemograma e marcadores tumorais avaliados.

Após estabelecer os valores de corte pelas curvas ROC, foi realizada uma análise multivariada, que mostrou que uma contagem absoluta de monócitos $> 312/mm^3$ está associada a forte imunomarcção estromal (2/3) de TNFR1, e um valor plaquetário $\leq 298.000/mm^3$ está associado a forte (2/3) imunomarcção estromal de TNFR2 (Tabelas 8 e 9). A Figura 8 mostra as diferenças nas medianas da contagem absoluta de monócitos nos grupos de TNFR1 de imunomarcção fraca e forte, e as diferenças nas medianas da contagem absoluta de plaquetas nos grupos de imunomarcção fraca e forte de TNFR2.

Tabela 8 – Análise multivariada das variáveis: idade, status hormonal, grau histológico, tipo de câncer de ovário, estadiamento e contagem absoluta de monócitos considerando imunomarcção estromal para TNFR1.

Variável	Análise Multivariada	
	OR (95% IC)	p-value
Idade (> 50 anos x ≤ 50 anos)	0.318 (0.028-3.591)	0.354
Status Hormonal (menopausa x menacme)	3.904 (0.302-50.5)	0.297
Grau Histológico (2/3 x 1)	0.376 (0.025-5.623)	0.479
Tipo (II x I)	4.581 (0.326-64.363)	0.259
Estadiamento (III/IV x I/II)	0.357 (0.052-2.438)	0.294
Contagem de Monócitos (> 312/mm ³ x ≤ 312/mm ³)	11.365 (1.485-86.956)	0.019

Tabela 9 – Análise multivariada das variáveis idade, status hormonal, grau histológico, tipo de câncer de ovário, estadiamento, Ca-125 sérico e contagem absoluta de plaquetas considerando a imunomarcção estromal com TNFR2.

Variável	Análises Multivariadas
----------	------------------------

	<i>OR (95% IC)</i>	<i>p-value</i>
Idade (> 50 anos x ≤ 50 anos)	5.9 (0.584-59.643)	0.133
Status Hormonal (menopausa x menacme)	0.153 (0.014-1.664)	0.123
Grau Histológico (2/3 x 1)	2.117 (0.184-24.324)	0.547
Tipo (II x I)	0.354 (0.031-4.034)	0.403
Estadiamento (III/IV x I/II)	0.703 (0.131-3.780)	0.681
Ca-125 (≤ 65.16U/mL x > 95.16 U/mL)	2.457 (0.552-10.948)	0.238
Contagem Plaquetária (≤ 298,000/mm ³ x >298.000/mm ³)	6.739 (1.398-32.483)	0.017

Figura 16: Curvas ROC relacionando imunomarcção estromal forte (2/3) e fraca (0/1) de TNF-alfa com contagem absoluta de basófilos e neutrófilos, TNFR1 com contagem absoluta de monócitos e valor de CA 125 e TNFR2 com contagem absoluta de plaquetas.

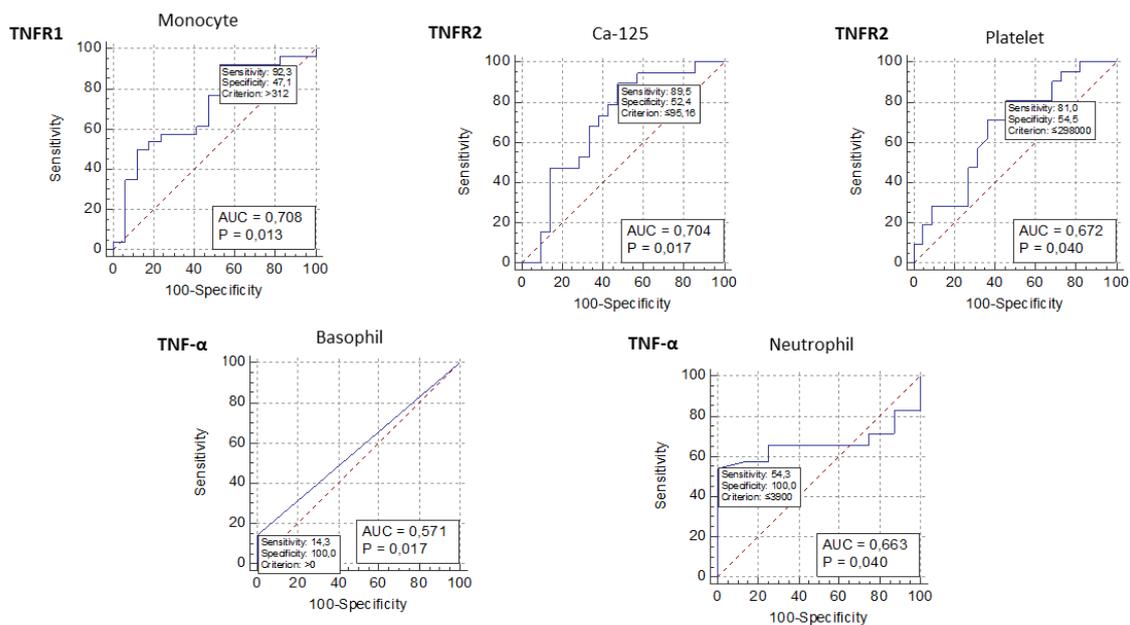
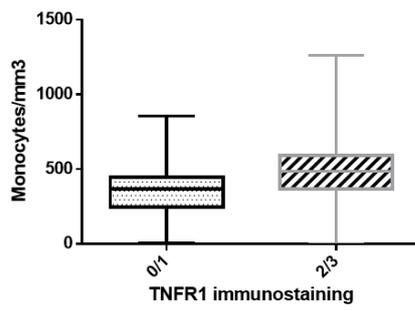
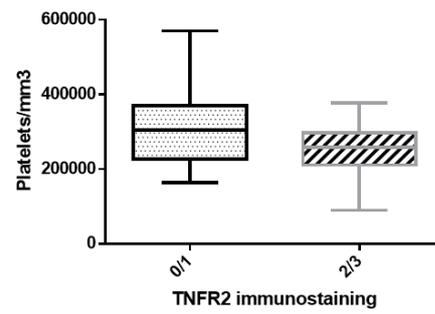


Figura 17: Diferenças nas medianas das contagens absolutas de monócitos nos grupos de imunomarcção fraca e forte de TNFR1, e as diferenças das medianas das contagens absolutas de plaquetas nos grupos de imunomarcção fraca (0/1) e forte (2/3) de TNFR2 ($p = 0,0266$ e $p = 0,0321$, respectivamente).

TNFR1 immunostaining and monocytes count



TNFR2 immunostaining and platelets count



DISCUSSÃO

A importância dos fatores de risco e proteção no processo de carcinogênese do câncer do ovário depende do seu tipo histológico. Os três tipos histológicos mais incidentes são o câncer epitelial do ovário, câncer de células germinativas e os tumores de células do cordão estromal sexual. Dentre esses, destaca-se o epitelial, responsável

por 90% dos casos novos, ampliando sua incidência a partir dos 40 anos de idade. Neste estudo, a idade média para o acometimento pela patologia foi de 56 anos. Os fatores reprodutivos apresentam um papel de destaque na história natural deste tipo de câncer (MEIRA, 2019). A incidência de carcinoma epitelial de ovário aumenta com o avanço da idade (INCA, 2022). O câncer de ovário é raro em mulheres com menos de 40 anos. A maioria dos cânceres de ovário se desenvolve após a menopausa. Metade de todos os cânceres de ovário é encontrada em mulheres com 63 anos de idade ou mais (*American Cancer Society*, 2022).

As neoplasias malignas de ovário com origem epitelial foram a maioria dos casos estudados. De fato, os tumores de origem epitelial são os mais frequentes, sendo responsáveis por mais de 90% dos casos. As neoplasias malignas epiteliais têm origem no mesotélio celômico embrionário presente na superfície ovariana, através da formação de um cisto no interior da cápsula ovárica. Este cisto apresenta crescimento por período indeterminado antes de ter capacidade de formação de metástases (PIVER, BARLOW, LELE, 1978; RUBIN, 1992; MURTA, ANDRADE, BIGHETTI, 1995). As formas de disseminação do câncer de ovário são por continuidade (atingindo órgãos adjacentes), e envio de células tumorais por via linfática, hematogênica e por esfoliação. Por via de esfoliação, células neoplásicas oriundas da superfície ovariana são levadas por movimentos de peristaltismo e diafragmáticos por toda cavidade peritoneal (FELDMAN & KNAPP, 1974). A disseminação linfática é frequente, ao contrário da hematogênica.

Nos casos avaliados, o diagnóstico em fase inicial aconteceu em 46,5% dos casos, dado que surpreende, já que uma característica importante do câncer de ovário é o diagnóstico tardio. Estudos mostram que apenas 20% dos casos afetados têm uma detecção precoce da doença (CHANDRA et al., 2019). A maioria dos casos (>80%) é

diagnosticada em estágio avançado, quando o tumor se espalhou para a cavidade peritoneal e órgãos abdominais superiores, após a doença já ter ultrapassado a cavidade pélvica (KUROKI, GUNTUPALLI, 2020). Em 2018, 295.000 novos casos de câncer de ovário foram diagnosticados, levando à morte de mais de 180.000 mulheres em todo o mundo. A taxa de sobrevida em 5 anos para câncer de ovário em estágio inicial (I, II) é de cerca de 90%, enquanto apenas 20 a 40% das pacientes com câncer de ovário em estágio tardio (III, IV) vivem além de cinco anos. Apesar dos avanços no tratamento, as pacientes com câncer de ovário têm uma sobrevida global em 5 anos de 45%, tornando esta doença a segunda neoplasia ginecológica mais letal. Cerca de três quartos dos cânceres de ovário epiteliais invasivos apresentam sintomas apenas em estágio avançado, enquanto os pacientes em estágio inicial apresentam apenas alguns sintomas leves e inespecíficos (Cancer Research UK, 2022). Apesar do amplo conhecimento obtido sobre essa complicação nos últimos anos, a taxa de sobrevida não melhorou significativamente devido a alguns desafios em diagnosticá-la e tratá-la o mais precocemente possível. Diferentes modificações em níveis moleculares e genéticos no câncer de ovário resultam em alguns desafios para estabelecer uma plataforma terapêutica (VAFADAR et al., 2020). À medida que a doença progride, fica ainda mais difícil tratar e gerenciar os pacientes. Muitos profissionais de saúde confundem câncer de ovário com outras doenças urológicas, abdominais e ginecológicas devido à sobreposição de sinais e sintomas, resultando em detecções tardias. Os ovários não têm cobertura peritoneal; portanto, o câncer se espalha localmente para a cavidade peritoneal, resultando em sintomas. A ausência de ferramentas e equipamentos de teste eficazes atrasa ainda mais o processo de detecção de CO. Conforme observado anteriormente, a detecção precoce é crucial para aumentar as taxas de sobrevida de pacientes com CO em estágio avançado. Os biomarcadores são divididos em categorias

de diagnóstico, prognóstico, preditivo e de resposta. Baixa sensibilidade e falta de especificidade são os desafios para a maioria dos biomarcadores estudados (CHANDRA et al., 2019).

O modelo dualista de carcinogênese ovariana condensa os principais subtipos histopatológicos em tipo I e tipo II com base em componentes clínicos, genéticos e de desenvolvimento. Em termos de diagnóstico, cerca de 30% dos carcinomas ovarianos diagnosticados são do tipo I e 70% são do tipo II. Nesta análise, a maioria dos casos foi do tipo II (55,8% das pacientes). Os tumores do tipo I são geralmente confinados aos ovários (estádio I) e têm prognóstico favorável, sendo responsáveis por 10% das mortes relacionadas ao câncer de ovário. Ao contrário, os tumores do tipo II mais agressivos, com maior grau de indiferenciação tecidual (o grau 3 foi o mais encontrado entre as pacientes desse estudo). São diagnosticados em estádios avançados (III, IV), onde a cura não é provável. Os tumores do tipo II são responsáveis por 90% das mortes relacionadas ao câncer de ovário. Como resultado, alguns grupos propuseram que os tumores do tipo II deveriam se tornar o foco de uma triagem extensa para observar melhorias significativas no resultado. O desenvolvimento de estratégias de rastreamento novas e mais eficazes que visam tumores do tipo II tem o potencial de detectar cânceres agressivos em um estágio em que o tratamento ideal é possível (CHARKHCHI et al., 2020). O diagnóstico precoce de câncer de ovário no estágio I foi considerado o fator prognóstico mais importante para pacientes com câncer de ovário. Em nosso estudo, a percentagem de estadiamentos iniciais mais alto em relação à literatura pode estar relacionada a critérios um pouco mais rígidos para a indicação de cirurgia em massas anexiais, como o maior diâmetro de 7cm.

Neste estudo, também foi possível verificar associação entre glicemia ≤ 100 e forte marcação imunohistoquímica de TNF ($p=0,0091$). Este dado não corresponde aos

estudos descritos na literatura científica, os quais correlacionam a hiperglicemia com as doenças oncológicas. Alguns estudos mostram uma taxa reduzida de câncer de ovário em mulheres que ingerem dieta rica em vegetais ou pobre em gorduras, mas outros estudos discordam. A *American Cancer Society* recomenda seguir padrão alimentar saudável que inclua muitas frutas, vegetais e grãos inteiros e que limite carnes vermelhas e processadas, bebidas açucaradas e alimentos altamente processados (*American Cancer Society*, 2022).

O risco de câncer dos órgãos reprodutores femininos é aumentado em pacientes com Diabetes Mellitus. Tanto o risco de câncer de mama quanto de endométrio estão aumentados em mulheres diabéticas, e esse risco é independente da obesidade (fator promotor do câncer de mama, bem estabelecido), pois persiste mesmo após a correção de dados epidemiológicos para esta doença. Vários mecanismos biológicos podem estar envolvidos, principalmente em relação às anormalidades dos hormônios sexuais. A hiperinsulinemia pode aumentar os níveis de estrogênios bioativos ao diminuir a concentração circulante de globulina ligadora de hormônios sexuais e também pode estimular a síntese de andrógenos no estroma ovariano (KAAKS et al., 1996). Outros mecanismos possíveis incluem menarca tardia, especialmente em mulheres diabéticas tipo 1, que também apresentam maior incidência de nuliparidade, menstruação irregular e distúrbios de fertilidade (VIGNERI et al., 2009).

Em estudo, Jammal et al. identificou sobrevida global significativamente maior em pacientes com câncer de ovário tipo I, do que em pacientes com tipo II, e também naquelas com glicemia de jejum pré-operatória menor que 100 mg / dL, o que corrobora com o achado deste estudo: correlação da hiperglicemia com forte marcação imunohistoquímica de TNF.

Estudos sugerem o papel do TNF- α e seus receptores (TNFR1 e TNFR2) na biologia do câncer de ovário e na patogênese do tumor (HASSAN et al., 1999; PIURA et al., 2014), e relação com fatores prognósticos (MARTINS-FILHO et al., 2014; SILVA et al., 2021; DOBRZYCKA et al., 2009).

Os níveis de TNF- α foram medidos em frações séricas e citosólicas de pacientes com câncer de ovário e pacientes controle, demonstrando níveis elevados de TNF- α no grupo de pacientes com câncer. A imunomarcagem de TNF- α foi positiva em lesões malignas e negativa para tecido ovariano normal (HASSAN et al., 1999). Um estudo avaliou por imuno-histoquímica a expressão de IL-1, IL-6, TGF- β , TNF- α , COX-2, iNOS e NF-kB em cânceres de ovário seroso e mucinoso, e demonstrou que a expressão de IL-1, TNF- α e COX-2 aumentaram com o estágio da doença em tumores serosos e mucinosos (PLEWKA et al. 2014). Os níveis séricos de IL-6, IL-8 e TNF- α foram avaliados por ELISA. Os níveis séricos de IL-8 e TNF- α foram maiores em pacientes com câncer de ovário em comparação com lesões císticas ovarianas benignas. O nível de corte de IL-8 e TNF- α foi de 4,09 ng/mL e 2,63 ng/mL, respectivamente (sensibilidade e especificidade de 70% e 96% para IL-8 e 85,7% e 79,3% para TNF- α) (PAWLIK et al. 2021). Outro estudo avaliou o envolvimento de células T auxiliares e células T reguladoras no câncer de ovário epitelial, e examinou as porcentagens de células Th22, Th17, Th1 e T reguladoras no sangue periférico de câncer de ovário epitelial, neoplasia epitelial ovariana benigna e células saudáveis. controle por citometria de fluxo. As concentrações plasmáticas de IL-22 e TNF- α foram significativamente elevadas em pacientes com câncer de ovário epitelial em comparação com os outros 2 grupos. Além disso, em pacientes com câncer de ovário, houve uma tendência aumentada de Th22, IL-22 e TNF- α em pacientes em estágio III-IV em comparação com pacientes em estágio I-II, e uma correlação positiva entre Th22, Th17

e Th1 células (WANG et al., 2017). Em nosso estudo, a imunomarcagem do TNF- α estromal foi mais intensa comparando neoplasias ovarianas benignas e malignas com lesões não neoplásicas. Por outro lado, não houve diferença significativa comparando neoplasias benignas e malignas.

PIURA et al. (2014) extraiu o RNA total de tecidos ovarianos normais e malignos e o mRNA foi analisado com reação em cadeia de transcriptase reversa-polymerase semiquantitativa (RT-PCR). O estudo imuno-histoquímico foi realizado para TNFR1 e TNFR2. Os níveis de mRNA de TNF- α e mRNA de TNFR2 foram maiores em carcinomas em comparação com tecidos ovarianos normais, e os níveis de mRNA de TNFR1 foram semelhantes. TNFR1 e TNFR2 foram localizados principalmente nas células neoplásicas epiteliais do tumor (PIURA et al., 2014). Outro estudo mostrou que o TNFR1 foi superexpresso no câncer de ovário, desempenhando um papel importante no câncer de ovário, com potencial de ser uma molécula prognóstica no câncer de ovário (PENG et al., 2015). No presente estudo, a imunomarcagem do TNFR1 foi mais forte no estroma de neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas, e mais forte quando comparadas neoplasias benignas com lesões ovarianas não neoplásicas. Não houve diferença comparando TNF R1 estromal entre câncer de ovário e lesões não neoplásicas.

Os níveis séricos de TNFR2 podem ter uma associação com fatores prognósticos no câncer de ovário (NOMELINI et al., 2018). Na avaliação da ascite em pacientes com câncer de ovário, foram encontrados níveis elevados de citocinas imunossupressoras (sTNFR2, IL-10 e TGF- β) e pró-inflamatórias (IL-6 e TNF) nesse fluido. A expressão de TNFR2 em todos os subconjuntos de células T foi maior em Tregs CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ (KAMPAN et al., 2017). Por outro lado, uma meta-análise foi realizada avaliando as associações entre os níveis circulantes de proteína C-reativa, IL-

6, TNF- α e receptor solúvel de TNF α 2 (TNFR2) e o risco de câncer de ovário, e demonstrou que que níveis elevados de proteína C reativa, mas não IL6 circulante, TNF- α ou TNFR2 solúvel, estão associados a um risco aumentado de câncer de ovário (ZENG et al., 2016). Nossos dados demonstraram que a imunomarcção estromal do TNFR2 foi mais forte em neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas e mais forte em neoplasias malignas em comparação com lesões não neoplásicas. Mas não houve diferença comparando a imunomarcção do estroma de neoplasias benignas e lesões não neoplásicas.

A imunomarcção mais forte do TNF- α foi associado ao grau histológico 1 e estádios iniciais do câncer de ovário em um estudo que realizou imuno-histoquímica para IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF- α e iNOS (MARTINS-FILHO et al., 2014). Um estudo avaliou o nível de expressão proteica de TNFR2 e transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) em tecidos serosos de câncer de ovário de alto grau em relação à resposta à quimioterapia à base de platina e ao resultado prognóstico. Pacientes com forte expressão de TNFR2 e STAT3 tiveram intervalo de sobrevida livre de progressão significativamente maior no grupo sensível à platina (SILVA et al., 2021). A expressão gênica e proteica de HMGB1, TLR4, NF κ B e TNF - α foi significativamente aumentada no estágio avançado do tumor e no grupo pouco diferenciado em câncer de ovário epitelial maligno (JIANG et al., 2018). Em outro estudo, em pacientes com câncer de ovário, houve tendência de aumento de Th22, IL-22 e TNF- α em pacientes em estágio III-IV em comparação com pacientes em estágio I-II, avaliadas por citometria de fluxo. (WANG et al., 2017). Por outro lado, não foram observadas diferenças comparando TNF- α nas frações sérica e citosólica em pacientes com câncer de ovário em relação aos tipos histológicos (carcinomas seroso, mucinoso e endometriode) e ao estágio da doença (HASSAN et al., 1999). Os níveis de TNF- α e

seus receptores solúveis tipo I (sTNFR1) e tipo II (sTNFR2) foram estudados em líquido intracístico e soro de neoplasias ovarianas benignas e malignas. A concentração de sTNFR2 nas amostras intracísticas de câncer de ovário foi maior do que a das neoplasias benignas, e níveis intracísticos mais elevados de sTNFR2 associados a tumores graus 2 e 3 (NOMELINI et al., 2018). O TNFR2 é um importante alvo proteico para novos estudos sobre o tratamento do câncer de ovário, pois está presente em Tregs imunossupressoras e em tumores humanos (CHEN et al., 2013; GOVINDARAJ et al., 2013). Um estudo sugere que anticorpos TNFR2 antagonistas podem ser um novo tratamento para câncer de ovário TNFR-positivo, visando células tumorais e Tregs associadas a tumores imunossupressores (TORREY et al., 2017).

O TNF tem ações pleiotrópicas e pode induzir tanto a morte celular quanto a resistência à apoptose (KARIN e LIN, 2002). O TNF e seus receptores são regulados positivamente durante a monopoiese e expressos por monócitos circulantes, bem como monócitos efetores que infiltram certos locais de inflamação. O TNF de monócitos autônomos pode ser crítico para a função dessas células (WOLF et al., 2017).

Outro estudo demonstrou que a produção de TGF α em carcinoma seroso de ovário de alto grau leva os monócitos a se diferenciarem em macrófagos. Isso sugere um papel importante no mecanismo pelo qual os macrófagos ativados alternativamente são gerados no microambiente do tumor (FOGG et al., 2020). Três subpopulações de monócitos podem ser distinguidas no sangue humano: clássica (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$), intermediária (CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$) e não clássica (CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$). Os monócitos podem ter o nível de expressão mais alto de TNFR2 (HIJDRA et al., 2012). Nosso estudo demonstrou que uma contagem absoluta de monócitos $> 312/\text{mm}^3$ está associada a forte imunomarcagem estromal (2/3) de TNFR1.

As plaquetas têm sido reconhecidas como células inflamatórias, mas os efeitos do TNF- α e seus receptores sobre a atividade plaquetária ainda não são bem compreendidos. O fator de necrose tumoral α desempenha um papel importante na resposta inflamatória e atua através de dois receptores, TNFR1 e TNFR2. Um estudo demonstrou que o TNF- α modula negativamente a agregação plaquetária induzida por ADP via receptores TNFR1/TNFR2, reduzindo os níveis citosólicos de Ca⁺⁺ e inibindo a ativação do receptor de c-*Src* e fibrinogênio, que ocorre por meio de cAMP e cGMP independentes (BONFITTO et al. , 2018). TACCHINI-COTTIER et al. (1998) demonstraram que o TNF pode induzir o consumo de plaquetas agindo não diretamente nas plaquetas, mas no TNFR1 de outras células, provavelmente aumentando a liberação de fatores com atividade agonista para as plaquetas (TACCHINI-COTTIER et al., 1998). O TNF pode induzir trombocitopenia devido à redução da vida útil das plaquetas. O TNF ativa as caspases plaquetárias via TNFR1, o que resulta em fragmentação plaquetária e trombocitopenia (PIGUET et al., 2002). Nosso estudo demonstrou associação de níveis mais baixos de plaquetas com TNFR2, o que foi confirmado após análise multivariada.

A principal limitação do estudo é a heterogeneidade dos tipos histológicos de lesões e neoplasias ovarianas. Mas este trabalho tem muitos pontos fortes. Até onde sabemos, é o primeiro estudo na literatura que avaliou o TNF- α estromal e seus receptores em 3 grupos de tumores ovarianos: lesões não neoplásicas, neoplasias benignas e neoplasias malignas. E os resultados demonstram uma imunomarcagem mais forte no câncer de ovário, sugerindo que o TNF- α e seus receptores podem ser alvos de novos estudos para verificar seu papel na carcinogênese e na progressão das neoplasias ovarianas.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A imunomarcção do TNF- α estromal foi mais intensa comparando neoplasias ovarianas benignas e malignas com lesões não neoplásicas. A imunomarcção para TNFR1 foi mais forte no estroma de neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas, e mais forte quando comparadas neoplasias benignas com lesões ovarianas não neoplásicas. A imunomarcção estromal de TNFR2 foi mais forte em neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas e mais forte em neoplasias malignas em comparação com lesões não neoplásicas.

A contagem absoluta de monócitos $> 312/\text{mm}^3$ está associada a forte (2/3) imunomarcção estromal de TNFR1, e a contagem de plaquetas $\leq 298.000/\text{mm}^3$ está associada a forte (2/3) imunomarcção estromal de TNFR2.

Em relação a sobrevida livre de doença e sobrevida global, não houve diferenças entre imunomarcção fraca e forte de TNF- α , TNFR1 e TNFR2

Nosso estudo é importante para que novas pesquisas sobre o assunto possam estabelecer com mais clareza sobre os mecanismos imunológicos e inflamatórios que regem a resposta sistêmica a partir da resposta tecidual. O estudo dessas interações entre a resposta tumoral local e sistêmica também será importante na descoberta de novos fatores prognósticos e novos alvos para o tratamento do câncer de ovário, que hoje é realizado basicamente com cirurgia e quimioterapia.