

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PATOLOGIA HUMANA**

**ISAC SOUZA SILVA RODRIGUES**

**NÍVEIS DE INTERLEUCINAS NO LÍQUIDO PERITONEAL EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS DE OVÁRIO**

**UBERABA- MG**

**2018**

**ISAC SOUZA SILVA RODRIGUES**

**NÍVEIS DE INTERLEUCINAS NO LÍQUIDO PERITONEAL EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS DE OVÁRIO**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Co-orientadores: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta e Prof.<sup>ª</sup>. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta

**UBERABA – MG**

**2018**

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

R613n Rodrigues, Isac Souza Silva  
Níveis de interleucinas no líquido peritoneal em pacientes com neoplasias de ovário / Isac Souza Silva Rodrigues. – 2018.  
74 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini  
Coorientadores: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta e Profa. Dra. Beatriz Martins Tavares Murta

1. Neoplasias ovarianas. 2. Interleucina-6. 3. Interleucina-8. 4. Líquido Ascítico. 5. Ascite. 6. Prognóstico. I. Nomelini, Rosekeila Simões. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.11-006

**ATESTADO DE APROVAÇÃO**

Uberaba, 16 de janeiro de 2018.

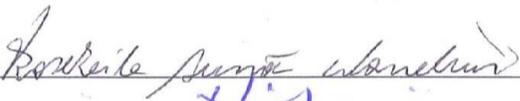
Defesa de dissertação e exame final de **ISAC SOUZA SILVA**, candidato  
(a) ao grau de Mestre (a) em Ciências – Patologia Humana.

A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM,  
para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Dissertação de Mestrado  
“NÍVEIS DE INTERLEUCINAS NO LÍQUIDO PERITONEAL EM PACIENTES  
COM NEOPLASIAS DE OVÁRIO” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde (área de concentração Patologia Humana), bem como ao exame final.

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

A COMISSÃO:

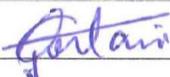
Dra. Rosekeila Simões Nomelini

  
\_\_\_\_\_

Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara

  
\_\_\_\_\_

Dr. Guilherme Vannucchi Portari

  
\_\_\_\_\_



**ISAC SOUZA SILVA RODRIGUES**

**NÍVEIS DE INTERLEUCINAS NO LÍQUIDO PERITONEAL EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS DE OVÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

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

15 de Janeiro de 2018

Banca Examinadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosekeila Simões Nomelini (Orientadora)

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Guilherme Vannucchi Portari

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

*Não deveria haver fronteiras ao esforço humano.  
Por pior que a vida pareça, enquanto houver vida haverá esperança.  
(Stephen Hawking)*

Dedico esse trabalho aos meus pais e esposa, por em todos os momentos de minha vida terem sido como um porto seguro onde eu pude me refugiar e conseguir me reerguer novamente.

## AGRADEÇO

*A Deus primeiramente por ter estado comigo em tudo, em cada passo, pensamento e ação, não importando os meus erros e acertos, pois somente nele confio ele é a minha esperança, meu passado, meu presente e futuro. “Os que confiam no Senhor serão como o monte de Sião que não se abala mas permanece para sempre” (Salmos 125.1)*

*Aos meu amados pais, **Elias Rodrigues e Nerli Souza Silva Rodrigues**, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio nas horas mais difíceis, em que estiveram ao meu lado e em orações feitas a Deus para que cuidasse de mim em cada dia da minha vida, por enfrentarem tudo ao meu lado e nunca desistirem um só dia, independente de quão difícil seria a luta.*

*A minha amada esposa, **Aline Garcia Rodrigues**, por todo o seu amor, carinho, apoio, compreensão, admiração e incentivo, são para mim inexplicáveis e essenciais em minha vida.*

*A professora **Dra. Rosekeila Simões Nomelini**, pela oportunidade, paciência, profissionalismo, seriedade e dedicação que sempre foram marcas do seu trabalho, servindo para mim como um bom exemplo a ser seguido. Pela facilidade em solucionar os problemas que surgiram durante a realização deste trabalho. Sou grato pela atenção e paciência na realização deste trabalho.*

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

*A professora **Dra. Beatriz Martins Tavares Murta**, pela co-orientação e auxílio no delineamento do trabalho, por disponibilizar, sem reservas, todo espaço físico do laboratório de farmacologia.*

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

*Aos meus parceiros de orientação pela execução em conjunto da coleta de material, e na realização dos ensaios de ELISA presentes neste trabalho.*

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

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

**RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** A neoplasia maligna de ovário é um dos cinco tipos de câncer mais comuns em mulheres e a principal causa de mortalidade causada por doenças malignas ginecológicas em países desenvolvidos. O diagnóstico ocorre com mais frequência em estádios avançados da doença, onde a resposta ao tratamento é menor. Ainda não há uma forma de rastreamento eficaz para se detectar está neoplasia em seu estágio inicial.

**OBJETIVO:** Analisar a dosagem de citocinas (padrão Th1: IL-2, IL-8, e TNF- $\alpha$ ; padrão Th2: IL-5, IL-6 e IL-10) no lavado peritoneal e comparar os resultados entre lesões não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas primárias de ovário, além de relacionar as dosagem dessas citocinas com parâmetros prognósticos clínicos e patológicos em câncer de ovário.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Foram avaliadas 117 pacientes foram avaliadas, divididas em três grupos: lesões não neoplásicas de ovário (n=14), lesões benignas (n= 74), e lesões malignas de ovário (n= 29) pacientes. Montamos um banco de dados a partir dos prontuários com: idade, paridade, *status* hormonal, tipo histológico, e no caso de tumores malignos, grau histológico, estadiamento (FIGO), e resultados dos ensaios de cada citocina dosada no lavado peritoneal/ascite. Os resultado entre os grupos de lesões não neoplásicas, benignas e malignas foram comparados através de teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e comparações de citocinas com fatores prognósticos foi utilizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS:** Na avaliação das citocinas no lavado peritoneal foi observado que IL-6 e IL-8 foram mais relacionadas ao fatores prognósticos. Níveis mais altos de IL-6 foram relacionados com RNL  $> 4$  ( $p=0.0311$ ), PLR  $> 200$  ( $p=0.0051$ ), CA125  $> 35$  U/mL ( $p=0.0019$ ), anemia ( $p=0.0027$ ),

estádio IIIC ( $p=0,0203$ ) e SLD  $\leq 24$  meses ( $p=0.0267$ ). Níveis mais altos de IL-8 estiveram relacionados com RNL  $> 4$  ( $p=0,0241$ ), PLR  $>200$  ( $p=0,0426$ ) CA125  $> 35$  U/mL ( $p=0,0292$ ).

**CONCLUSÃO:** IL-6 e IL-8 no lavado peritoneal estiveram relacionadas com fatores de mau prognóstico. A avaliação dessas citocinas poderia levar o oncologista a individualizar o tratamento das pacientes e ser alvo de estudo para novas terapias em câncer de ovário.

Palavras-chave: IL-6, IL-8, fatores prognósticos, câncer de ovário citocinas

# **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Malignant neoplasm of ovary is one of the five most common cancers in women and the leading cause of gynaecological malignancy in developed countries. Ascites is an inflammatory environment rich in mediators of inflammation, and inflammatory cytokines could be used as prognostic factors.

**OBJECTIVE:** The objectives of the study were to analyze the dosage of a cytokines panel (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10 and TNF- $\alpha$ ) in the peritoneal fluid and relate the dosage of these cytokines to clinical and clinical prognostic parameters pathologies in ovarian cancer.

**MATERIAL AND METHODS:** We evaluated 117 patients, divided into three groups: non-neoplastic ovarian lesions (n = 14), benign lesions (n = 74), and malignant ovarian lesions (n = 29). We created a database with age, parity, hormonal status, histological type and in the case of malignant tumours, tumour grade, stage (FIGO) and test results of each cytokine analysed in ascites or peritoneal lavage. The results between the groups of non-neoplastic, benign and malignant lesions were compared through the Kruskal-Wallis test with Dunn post-test, cytokines and prognostic factors comparisons was used the Wilcoxon-Mann-Whitney test and considered significant when  $p < 0.05$ .

**RESULTS:** We evaluated 29 patients with ovarian cancer. Higher levels of IL-6 were related to RNL  $> 4$  ( $p = 0.0311$ ), RPL  $> 200$  ( $p = 0.0051$ ), CA-125 levels  $> 35$  U / mL ( $p = 0.0019$ ), stage IIIC ( $p = 0.0203$ ), and SLD  $\leq 24$  months ( $p = 0.0267$ ). In the evaluation of IL-8, higher levels of this cytokine were related to NLR  $> 4$  ( $p = 0.0241$ ), RPL  $> 200$  ( $p = 0.0426$ ), and CA125  $> 35$ U / mL ( $p = 0.0292$ ).

**CONCLUSION:** IL 6 and IL 8 in the peritoneal lavage were related to poor prognostic factors. The evaluation of these cytokines may lead the oncologist to individualize the adjuvant treatment making it more or less aggressive; depending on the profile of each patient, as well as these cytokines may be the target of new therapies in ovarian cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Frequência (%) em cada estadiamento para câncer ovariano segundo os critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Maligna.....33
- Figura 2:** Grau de diferenciação histológica das neoplasias malignas.....34
- Figura 3:** Relação das citocinas (mediana, percentis 25 e 75) entre os grupos não neoplásicos, benignos e malignos (Kruskall-Wallis, com pós-teste de Dunn). \* $p=0.0241$  comparando-se com o grupo não neoplásicos.....35
- Figura 4:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) em relação a  $RNL < 4$  e  $RNL > 4$ . # $p=0,0311$  e \*\* $p=0.0241$ , comparados com  $RNL < 4$ .....37
- Figura 5:** comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) em relação a  $RPL < 200$  e  $RPL > 200$ . ## IL-6  $p= 0,0051$  e \*\*IL-8  $p= 0,0426$  comparados com  $RPL < 200$ .....38
- Figura 6:** comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) em relação a  $CA125 < 35$  e  $CA125 > 35$ . ### IL-6  $p=0,0019$  e \*\*\*IL-8  $p=0.0291$  comparados com  $CA125$  normal.....39
- Figura 7:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) em relação a  $CA15-3 < 31$  e  $CA15-3 > 31$ . \*IL-10  $p= 0,0481$  comparado com  $CA 15.3 > 31$ .....40
- Figura 8:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) em relação a  $CA-19.9 \leq 35$  U/ml  $CA 19.9 > 35$  U/ml.....47
- Figura 9:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) em relação a hemoglobina  $< 12$  g/dL e hemoglobina  $> 12$ g/dL. ####  $p= 0.0027$ , comparado com hemoglobina  $< 12$ .....41
- Figura 11:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas ( $n=29$ ) comparando pacientes com estágio I/II com paciente estágio III/IV.....43

**Figura 11:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com estágio I/II com paciente estágio III/IV.....44

**Figura 13:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com tipo 1 com paciente tipo 2.....45

**Figura 14:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com a sobrevida livre de doença <24 meses com paciente com a sobrevida livre de doença >24 meses. (IL-6 p=0.0267) .....46

**Figura 11:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com a sobrevida global <60 meses com paciente com a sobrevida global>60 meses.....47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características dos três grupos de pacientes comparados no estudo.....	30
<b>Tabela 2:</b> Classificação histológica das lesões não neoplásicas de ovário.....	30
<b>Tabela 3:</b> Classificação histológica das Lesões Neoplasias Benignas.....	31
<b>Tabela 4:</b> Classificação histológica das Neoplasias Malignas.....	32
<b>Tabela 5:</b> Relação das citocinas (mediana, percentil 25 e percentil 75) e fatores prognósticos laboratoriais em neoplasias malignas de ovário.....	36
<b>Tabela 6:</b> Relação das citocinas (mediana, percentil 25 e percentil 75) e fatores prognósticos em neoplasias malignas de ovário.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Aflibercept-** Inibidor do fator de crescimento endotelial vascular -VEGF

**ADENEX** - *Assessment of Different Neoplasias in the adnexa*

**BRCA1** - Gene supressor de tumor *breast cancer 1*

**BRCA2** - Gene supressor de tumor *breast cancer 2*

**CA 125** - Antígeno do câncer 125

**CA 15-3** - Antígeno do câncer 15.3

**CA 19-9** - Antígeno do câncer 19.9

**CD 8-** Receptor de membrana do linfócito T citotóxico

**CD 9-** Glicoproteína de superfície celular pertencente à família das tetraspaninas

**CD 25-** Vide IL2R $\alpha$

**CD 122-** Vide IL2R $\beta$

**CD 132-** Subunidade de receptor de interleucina-2

**Células NK-** Linfócitos Natural Killer

**CIMBA-** *Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2*

**CXCR4-** CXC tipo de receptor de quimiocina 4

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**dsDNA-** DNA de fita dupla

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EUA**- Estados Unidos da América

**FANC**- *Fanconi anemia complementation*

**FIGO** - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

**FOXP3**- *Forkhead box protein 3*

**HE4** - Proteína humana 4 derivada do epidídimo

**IL1 $\beta$** - Interleucina 1 beta

**IL-2** - Interleucina 2

**IL-2R $\alpha$** - Cadeia alfa do receptor de Interleucina-2

**IL-2R $\beta$** - Cadeia beta do receptor de Interleucina-2

**IL-5**- Interleucina 5

**IL-6**- Interleucina 6

**IL-6R**- Receptor de Interleucina 6

**IL-7**- Interleucina 7

**IL-8**- Interleucina 8

**IL-10**- Interleucina10

**IL-17**- Interleucina 17

**IL-35**- Interleucina 35

**IOTA** - *International Ovarian Tumour Analysis*

**IPON** - Instituto de Pesquisa em Oncologia

**kDa**- Quilodalton

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear kappa B

**MMPs**- Matriz metaloproteinase

**MUC1**- *Tethered Human Mucins -1*

**MUC 16**- Mucina 16

**PALB2**- *Partner and localizer of BRCA2*

**PARP 1**- Poli [ADP-ribose] polimerase 1

**PBS** - Tampão salino fosfato

**PCR**- Proteína C reativa

**PDGF-BB**- O fator de crescimento derivado de plaquetas-BB

**PFS**- *progression free survival*

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**RANTES**- *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted-CCL5*

**RAD 51**- *Radiation sensitivity 51*

**RAD51C**- *Radiation sensitivity51C*

**RAD 52**- *Radiation sensitivity 52*

**RH**- Recombinação homóloga

**RNA<sub>m</sub>**- RNA mensageiro

**RNL**- Relação neutrófilo linfócito

**RPA**- Proteína A replicativa

**RPL**- Relação plaqueta linfócito

**SKOV3**- Células de adenocarcinoma de ovário de origem epitelial

**SEREX**- Análise de serotipos de bibliotecas de expressão de DNA recombinante

**ssDNA**- DNA de fita simples

**STAT3**- Signal Transducers and Activators of Transcription 3

**TGF- $\beta$**  - Fator de transformação do crescimento beta

**TGF- $\beta$ 1**- Factor de crescimento transformante beta 1

**TNF**- Fator de necrose tumoral

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral-alfa

**TNFR1**- Receptor de TNF- $\alpha$  1

**TNFR2**- Receptor de TNF- $\alpha$  2

**UFTM** - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**US**- Ultrassonografia

**VEGF** - Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 BRCA 1 E BRCA2.....	4
1.1.1 RAD51.....	6
1.1.2 PARP 1.....	6
1.1.3 RAD52.....	7
1.2 ULTRASSONOGRAFIA E MARCADORES TUMORAIS.....	8
1.2.1 CA 125.....	10
1.2.2 CA19-9.....	11
1.2.3 HE 4.....	12
1.2.4 CA 15.3.....	12
1.3 CITOCINAS NO CÂNCER DE OVÁRIO.....	12
1.3.1 VEGF.....	14
1.3.2 Perfil Th1.....	15
1.3.2.1 IL2.....	15
1.3.2.2 IL8.....	16
1.3.2.3 TNF- $\alpha$ .....	16
1.3.3 Perfil Th2.....	20
1.3.3.1 IL-5.....	20
1.3.3.2 IL-6.....	21
1.3.3.3 IL-10.....	22
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4 HIPÓTESE.....</b>	<b>29</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>31</b>
5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	32
5.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	32

5.3	COLETA DO LÍQUIDO PERITONEAL.....	33
5.4	ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO.....	33
5.5	DOSAGEM DE CITOCINAS .....	33
5.6	DADOS ANALISADOS.....	34
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
6.1	RELAÇÃO DAS CITOCINAS ENTRE OS GRUPOS.....	41
<b>6.2</b>	<b>RELAÇÃO CITOCINAS COM FATORES PROGNÓSTICOS LABORATORIAIS ...</b>	<b>43</b>
6.3	RELAÇÃO CITOCINAS COM FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS.....	50
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Em 2017, foi a segunda maior causa de mortalidade estimada nos Estados Unidos, ficando com números menores somente para doenças cardiovasculares e a principal causa de morte em 21 estados. Estimativas apontaram que neste ano a incidência de novos casos de câncer seria de mais de um milhão e seiscentos e oitenta mil (1.688.780 novos casos de câncer) e a taxa de mortalidade foi acima de seiscentos mil casos (600.920 óbitos esperados por câncer em 2017). Em mulheres, a incidência de novos casos fica em mais de oitocentos e cinquenta mil casos (852.630), e a estimativa de mortes por câncer acima de duzentos e oitenta mil (282.500). O câncer também é a principal causa de morte em mulheres na faixa de idade de 40 a 79 anos (SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2017).

No Brasil, estimativa para o biênio 2016-2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, já a ocorrência em mulheres fica acima de trezentos mil novos casos (300.870) como os cânceres de mama (28,1%), cólon e reto (8,6%), colo do útero (7,9%), traqueia, brônquio e pulmão (5,3%), estômago (3,7%), corpo do útero (3,4%) e ovário (3,0%) (INCA, 2016).

A ocorrência de câncer na população mundial vem aumentando por vários fatores, como o aumento da população e envelhecimento, bem como a prevalência de fatores de risco estabelecidos, como tabagismo, excesso de peso, sedentarismo e mudanças nos padrões reprodutivos associados à urbanização e ao desenvolvimento econômico. Com base em estimativas, cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de óbitos ocorreram por câncer em 2012 em todo o mundo (TORRE et al., 2015).

O câncer de ovário é um dos cinco tipos de câncer mais comuns em mulheres e a principal causa de mortalidade causada por doenças malignas ginecológicas em países desenvolvidos. O diagnóstico geralmente ocorre em estádios mais avançados da doença, o que o faz menos responsivo aos tratamentos disponíveis, pois em sua progressão há sintomas inespecíficos e não há ainda uma forma de rastreamento eficaz para se detectar esta neoplasia em seu estágio inicial (LIANG et al., 2015).

Estima-se que em 2014 o número de casos novos de câncer de ovário tenha sido de 22.440 e a estimativa de óbitos ficou em 14.080 nos Estados Unidos, sendo a quinta causa de morte por câncer em mulheres com idades entre 60 e 79 anos e o quarto câncer a causar mais mortes na faixa de idade entre 40 e 59 anos. Sua maior mortalidade fica entre 40 a 79 anos, o que o leva a ser o quinto câncer a causar mais mortes em mulheres nos Estados Unidos no ano de 2014 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Comparando a uma escala global, a incidência de casos novos é de 238.700 e 151.900 de óbitos no ano de 2012, o que confirma uma alta taxa de mortalidade por esta neoplasia (TORRE et al., 2015).

Câncer de ovário pode ser diagnosticado em qualquer faixa etária, mas afeta principalmente mulheres a partir dos 50 anos, o que lhe torna ainda mais preocupante, pois neste período de idade ocorre os maiores índices de mortalidade causados por esta enfermidade. Os maiores riscos de desenvolver câncer de ovário aumentam quando a paciente tem histórico familiar associado com alguma síndrome genética. Mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2 (Gene supressor de tumor *breast cancer* 1 e2) levam ao desenvolvimento de câncer de ovário e de mama hereditários, por serem genes herdados de forma autossômica dominante, o qual ainda aumenta o risco de desenvolver outros cânceres, como de pâncreas e de próstata (ROETT & EVANS, 2009).

## 1.1 BRCA 1 E BRCA2

A identificação de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 podem auxiliar no diagnóstico risco aumentado de câncer de ovário, mesmo ainda não apresentando nenhum foco de tumor. Estes genes pertencem a dois cromossomos diferentes (17q21 BRCA1; 13q12.3 BRCA2) e pertence à classe de genes supressores de tumores, pois são responsáveis pela manutenção da estabilidade genômica e conseqüentemente pelo controle do crescimento celular. As proteínas BRCA1 e BRCA2 estão envolvidas na reparação de quebras do DNA de cadeia dupla principalmente através da recombinação homóloga (RH) (YOSHIDA & MIKY 2004; STAPLES & GOODMAN 2013; GIROLIMETTI et al.,2014).

A deficiência da função destas proteínas induz a um elevado grau de instabilidades cromossômicas, como quebra de cromossomos, aneuploidia grave, e amplificação do centrossoma, provavelmente por provocar o uso de vias alternativas a reparação de quebras de cadeias duplas, como a reparação através de união final não homóloga, pois esta não é conservadora e está associada a translocações, inserções e deleções, o que geralmente resulta em acumulação de eventos como mutações e quebra de cadeias duplas. Modificações genéticas ocorrem espontaneamente favorecidas por agentes que danificam DNA que induzem às quebras de cadeias duplas, principalmente DNA agente de ligação cruzada, mitocina ou platina compostos. Isto mostra por que pacientes com câncer de ovário que possuem mutações BRCA1 e BRCA2 exibem uma melhor resposta aos tratamentos quimioterápicos à base de platina quando comparados com pacientes com câncer de ovário esporádico (TUTT et al., 2001; DAVID et al., 2002; TAN et al., 2008; GIROLIMETTI, et al., 2014).

Estudos apontam que mulheres com mutações no gene BRCA1 desenvolvem carcinoma ovariano epitelial em 16 a 60%, enquanto que portadoras de mutações no gene BRCA2 somente 16 a 27% e estima-se que mutações germinativas nestes genes sejam responsáveis por 10% dos

casos de câncer epitelial de ovário não selecionados. Também tem mostrado que genes intactos, esses sem nenhuma mutação de BRCA e FANC (*Fanconi anemia complementation*), são capazes de reparar danos induzidos por quimioterapias à base de platina ao DNA. Apesar de serem mais agressivos que os câncer de ovário esporádicos, estes são mais sensíveis ao tratamento com componentes que atuam danificando o DNA de células com mutações em BRCA1 e BRCA2, por interferirem nas ligações cruzadas de DNA criar quebras de cadeia dupla na hélice não podendo ser reparadas no BRCA pela deficiência de recombinação homóloga. Há uma melhora observada na sobrevida a longo prazo de mulheres com câncer de ovário tratadas com platina se comparado com câncer de ovário esporádico. Quimioterapia com cisplatina intraperitoneal mostrou um desfecho favorável, a longo prazo, em mulheres com mutações em BRCA; também foram encontrados resultados semelhantes em pacientes tratados com doxorubicina lipossomal peguilhada (TAN et al.,2008; ADAMS et al.,2011; GALLAGHER et al.,2011; SAFRA et al.,2011; GIROLIMETTI, et al.,2014; KWA et al.,2014).

A grande maioria de cânceres com mutações nos genes BRCA 1 e 2 são, em sua grande maioria, em carcinomas serosos em estádios avançados. Um grande estudo foi relatado em 2012 pelo CIMBA (*Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2*), o qual envolveu 34 grupos de 20 países e confirmou que mais de 70% de câncer de ovário nos portadores de mutações em BRCA1 e BRCA2 são carcinoma seroso grau 3e que não há diferenciação morfológica, ou no grau de seu desenvolvimento, entre carcinomas serosos causados por mutações em BRCA1em comparação com BRCA2. Também evidenciou que alguns pacientes, antes de ter o diagnóstico de câncer ovariano, já tinham desenvolvido câncer de mama.( BOYD et al.,2000; MAVADDAT, et al.,2012; GIROLIMETTI, et al.,2014).

### **1.1.1 RAD51**

As proteínas que interagem com BRCA1 e BRCA2, como a RAD51, têm suas funções complementadas por proteínas codificadas por estes dois genes, a qual exerce uma função de reparação homóloga de quebra de cadeias duplas de DNA. Estudos demonstraram que BRCA2 realiza um papel importante na regulação do transporte intracelular, na atividade enzimática, e na função de RAD51. Outros estudos sugerem um papel de BRCA1 em alterar a estrutura da cromatina na presença de um dano do DNA para permitir o acesso para reparação. Mostrou-se que, na sequência avariada, a histona H2AX torna-se extensivamente fosforilada e forma focos em locais de ruptura. A proteína BRCA1 é recrutada para esses focos antes de todos os outros fatores, como a RAD51, sugerindo que H2AX e BRCA1 começam a reparação, modificando a estrutura da cromatina local, permitindo assim que as proteínas de reparo do DNA possam ter acesso aos locais danificados (PAULL, et al., 2000; YAMANE; KATAYAMA; TSURUO, 2000; MAGWOOD; MUNDIA; BAKER, 2012; GIROLIMETTI, et al.,2014).

### **1.1.2 PARP 1**

A PARP 1 (Poli [ADP-ribose] polimerase 1) é uma proteína envolvida na sinalização de danos ao DNA e na reparação de quebras de cadeias simples, mostrou-se ser essencial para a viabilidade de células cancerosas as quais possuem deficiência na via de recombinação homóloga. Além disso, células oriundas de câncer de ovário e mana hereditários, estes tendo mutações em proteínas de BRCA1 ou BRCA2, podem ser eliminadas usando inibidores de PARP 1 com poucos danos às células normais com pelo menos uma cópia funcional dos genes BRCA1 e 2. A inativação de PARP1 provoca erros na reparação do DNA de cadeias simples, a qual durante a replicação do DNA cadeias simples não reparadas podem provocar a quebra

de cadeias duplas de DNA, que são reparadas pela via de reparação homóloga. (LORD & ASHWORTH 2012; HUANG, et al., 2016).

O medicamento Olaparibe é uma pequena molécula inibidora da PARP de via oral, e foi o primeiro medicamento a entrar em ensaios clínicos de câncer de ovário e mostrar atividade clínica em mulheres mutações BRCA1/2. Em um estudo com 19 pacientes, que incluíram pacientes com câncer de ovário de mama e próstata, estes tendo mutações em BRCA1/2, 63% tiveram benefício clínico com respostas radiológicas ou de marcadores tumorais, ou por estabilização da doença durante quatro meses ou mais, em fase de expansão do câncer de ovário, houve uma resposta em 40% (FONG et al., 2010). As taxas de respostas foram associadas com o intervalo livre do tratamento à base de platina com benefício global de 69,2% em pacientes sensíveis a platina, 45,8% platina resistente, e 23,1% em grupos de platina-refratária. Um estudo multicêntrico de fase II avaliou a eficácia e segurança de monoterapia olaparibe por via oral na dose máxima tolerada (400 mg duas vezes por dia). Dois grupos de pacientes pré-tratados com uma média de três regimes anteriores de quimioterapia (intervalo 1-16) e mutações em BRCA1/2 foram inscritos. Uma resposta objetiva foi observada em 33% dos pacientes com 400 mg regime de duas vezes por dia e 13% dos 100 mg grupo duas vezes por dia, com um PFS (*progression free survival*) mediana de 5,8 meses (AUDEH et al., 2010; LEDERMANN, 2016).

### **1.1.3 RAD52**

A RAD52 é uma proteína de recombinação homóloga que é importante na manutenção da integridade do genoma, no entanto mutações em RAD52 não apresenta fenótipo significativo em mamíferos, porém quando associado com mutações em genes como BRCA1, BRCA2, PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) e RAD51C torna se letais. Também foi descoberto

que células cancerosas com mutações em BRCA1 e 2 são inviáveis quando a proteína RAD52 é inativada (FENG et al., 2011).

O mecanismo de RH da RAD52 ainda não foi bem esclarecido em mamíferos, em *Saccharomyces cerevisiae* pode ter função de mediador que ajuda a carregar o RAD51 recombinase em ssDNA( single-stranded DNA- DNA de fita simples) no local de quebra de cadeias duplas, que supera a o efeito da proteína A replicativa (RPA), uma proteína abundante que tem alta afinidade ao ssDNA, o filamento de RAD51 formado em ssDNA procura então o dsDNA homólogo e invade para formar moléculas de conjuntos (D-loops), que fornecem um molde e um iniciador dando início a reparação do DNA perdido da região dsDNA. Porém, a atividade de mediador da RAD52 não foi evidenciada em células humana *in vitro* (SUGIYAMA & KOWALCZYKOWSKI 2002; JENSEN, CARREIRA & KOWALCZYKOWSKI 2010; HUANG, et al., 2016)

## 1.2 ULTRASSONOGRAFIA E MARCADORES TUMORAIS

A ultrassonografia (US) é o exame de imagem principal para identificação e caracterização de tumores ovarianos, por ser um método de diagnóstico relativamente simples e não invasivo, que fornece uma informação útil e relevante para determinar a estratégia a ser tomada no tratamento da paciente. Estudos relatam que nos EUA, a US pode caracterizar com precisão 90% das massas anexais e a sensibilidade e especificidade para detecção de neoplasias ovarianas é de 88% - 96% e 90% - 96%, respectivamente (TIMMERMAN et al.,1999, VALENTIN L 1999 ; JUNG et al.,2015).

Grandes progressos foram feitos na busca de se padronizar e aperfeiçoar a classificação de massas anexiais através da US pelo *International Ovarian Tumour Analysis* (IOTA), que é

um grupo que conta com uma colaboração multicêntrica, com objetivo de elaborar ferramentas para o diagnóstico pré-operatório de câncer de ovário (NUNES et al., 2014).

O IOTA mostrou que a predição de risco para o diagnóstico de neoplasias ovarianas é viável. Foram desenvolvidos modelos matemáticos para prever quatro categorias: *tumoral benigno, borderline, câncer primário de ovário e câncer metastático (secundário)* (VAN CALSTER et al., 2010). Mas este estudo de certo ponto de vista era prejudicial, pois continha 754 pacientes com 40 cânceres limítrofes, 121 primários invasivos e 30 secundários metastáticos, e avaliaram estatisticamente mais de 30 marcadores clínicos e ultrassonográficos porém, o marcador tumoral CA-125 não foi considerado. Em modelos matemáticos utilizando o marcador CA 125 possui utilidade na distinção entre tumores benignos e malignos. Os modelos testados também não fizeram distinção entre a estágio I e estágios II-IV do câncer primário, o que é clinicamente importante (VERGOTE et al.,2001; VAN CALSTER et al.,2014).

A elaboração de um novo protocolo, o ADENEX (Assessment of Different Neoplasias in the adnexa), no qual selecionaram 5.909 mulheres em 24 centros em 8 países da Europa, China e Canadá, 17 com suspeita de acometimento do câncer de ovário durante o estudo. Conseguiram, com maior exatidão, diagnosticar cinco categorias do câncer de ovário: *benigno, borderline, fase I invasivos, estágio II-IV invasivo e câncer metastático (secundário)*. Este estudo considerou variáveis clínicas, como: idade das pacientes, nível sérico do marcador tumoral CA-125, histórico familiar de câncer de ovário, local de atendimento (centro de oncologia contra outros hospitais), e variáveis no exame de ultrassonografia; diâmetro máximo da lesão, a proporção de tecido sólido (diâmetro máximo do maior componente sólido dividido pelo diâmetro máximo da lesão), a presença de mais de 10 lóculos císticos, o número de projeções papilares, presença de sombras acústicas e presença de ascite. A implementação do

modelo ADNEX permite calcular o risco total de malignidade mesmo sem o nível de CA-125, apesar de que há diminuição do desempenho (VAN CALSTER et al., 2014). O volume do ovário, observado a partir de um exame de ultrassonografia, é um critério para uma avaliação adicional, o volume de corte para mulheres pre-menárquicas e pós-menopáusicas é de 8-10 cm<sup>3</sup> e para mulheres no período fértil de 18-20 cm<sup>3</sup>, este critério é bem utilizado em e serve como um alerta a qualquer lesão que possa estar se desenvolvendo nos ovários, podendo ser uma lesão não neoplásica, benigna ou maligna (MURTA & NOMELINI, 2006).

### **1.2.1 CA 125**

O uso de marcadores tumorais para diagnosticar câncer de ovário é amplamente utilizado, e um dos marcadores tumorais mais utilizados hoje é o CA-125 (Antígeno do câncer125), codificada no gene MUC 16 (mucina 16). Porém, seu uso isolado está longe de ser ideal para o diagnóstico consistente de câncer de ovário, pois se eleva em uma gama de doenças ginecológicas benignas comuns ou condições não ginecológicas (HAMED et al., 2013). No entanto, ele se eleva em cerca de 80% das mulheres com câncer epitelial de ovário, mas apenas 50% das mulheres com este câncer na fase inicial. Além disso, sua sensibilidade e especificidade não são suficientemente altos para rastreio de câncer de ovário na população em estádios precoces (ROSEN et al., 2005).

Utilizado como triagem, ultrassonografia transvaginal juntamente com CA 125 foi associado a uma sobrevida melhorada na população de alto risco, embora com alta sensibilidade e valor preditivo positivo (>80 e 25% respectivamente).Sessenta e nove por cento dos cânceres só foram detectados em estádios III e IV, porém este rastreio está associado com uma taxa de sobrevivência de 10 anos de 36% em portadores de mutações em BRCA1/2 (EVANS et al., 2009; ROSENTHAL et al., 2017).

## 1.2.2 CA19-9

Os tumores primários do trato gastrointestinal e ovários estão associados com a secreção de CA19-9. O CA19-9 é um mono-sialogangliósido, que está associada com vários tipos de tumores mucinosos no trato gastrointestinal, tais como no pâncreas e trato biliar, é um marcador útil na previsão de malignidade, em particular quando o nível do soro CA125 não é elevada (Cho & Kyung 2014). A diferenciação dos tumores malignos de tumores benignos é complexa, tornando o papel da CA-125 como ferramenta de triagem controversa na malignidade ovariana (Kelly *et al.*, 2010). O CA-125 sérico é frequentemente elevados em condições benignas, como a gravidez, a endometriose, e doença inflamatória pélvica, bem como em desordens malignas. Além disso, uma série de estudos sugere que a CA-125 não é elevada na maioria das neoplasmas mucinosos ovarianos primário (LU *et al.*, 2011).

CA 19-9, juntamente com CA125, tem sido proposto como marcadores com grande potencial na distinção de teratoma cístico maduro do câncer de ovário. Embora suas características na ultrassonografia sejam bem estabelecidas, o seu diagnóstico não pode ser dado somente por um exame de imagem, havendo um nível de CA 19-9 alto é muito difícil descartar a possibilidade de uma malignidade ovariana. O CA 19-9 tem se mostrado mais elevado em teratoma císticos maduros mais que o CA 125, porém a sua utilização não pode ser utilizado isoladamente para o diagnóstico desta malignidade (CHO *et al.*, 2013).

Cho & Kyung em 2014 sugeriram um possível papel do CA19-9 sérico no diagnóstico de tumores *borderline* de ovário ou malignos, apesar de várias deficiências, incluindo a desenho retrospectivo e um pequeno número de indivíduos. Contudo, os mesmo relatam que maiores estudos são necessários para esclarecer o papel diagnóstico do CA19-9 sérico na discriminação de tumores *borderline* e malignos de tumores de ovário benignos mucinosos.

### **1.2.3 HE 4**

A identificação de novos biomarcadores de câncer para substituir ou complementar CA 125 é urgentemente necessária e atualmente em curso. Um dos marcadores mais promissores é o HE 4 (Human Epididymis Protein 4). O HE 4 é expresso principalmente nos tratos respiratório e reprodutivo (GALGANO; HAMPTON & FRIERSON, 2006), é superexpresso em células de câncer do ovário, especialmente em subtipos histológicos de carcinoma seroso ou endometrióticos (DRAPKIN et al., 2005), e tem sido sugerido para ser um marcador sorológico de câncer de ovário (RUGGERI et al., 2011).

O HE4 utilizado juntamente com o CA-125 melhora a utilização do CA-125 como marcador tumoral no câncer de ovário. Esta utilização em conjunto pode permitir melhorar a detecção de câncer do ovário, em comparação com a utilização de qualquer um dos marcadores só para a discriminação de lesões benignas de ovários malignos (HAMED et al., 2013).

### **1.2.4 CA 15.3**

CA 15.3, ou MUC1 (Tethered Human Mucins -1), se expressa no revestimento epitelial de vários tecidos, exibindo forte expressão na glândula mamária e do trato reprodutor feminino durante a gravidez e lactação. CA 15.3 é superexpresso numa ampla variedade de cânceres, incluindo o da mama e do ovário. Evidências sugerem que este marcador tumoral pode desempenhar um papel na metástase do câncer, crescimento do tumor e a sobrevivência, a inibição da resposta imunitária, e prognóstica (WILLIAMS et al., 2014).

## **1.3 CITOCINAS NO CÂNCER DE OVÁRIO**

A tumorigênese do câncer de ovário se divide em duas principais vias, que correspondem ao desenvolvimento de tumores do tipo I e tipo II, que descrevem os caminhos para o

desenvolvimento do câncer de ovário e não sendo termos histopatológicos específicos. Os tumores tipo I desenvolve de forma gradual partir de precursores conhecidos, são altamente diferenciados e se desenvolvem a partir de lesões precursoras típicas, como cistoadenomas e tumores limítrofes, são inclusos neste grupo os tumores como; carcinoma seroso de baixo grau, carcinoma mucinoso, carcinoma endometrióide, tumor maligno de Brenner e carcinoma de células claras (SHIH; KURMAN, 2004; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014). São frequentemente confinados ao ovário, possui um genoma estável e sem mutações TP53, embora mutações somáticas sejam frequentemente detectadas em vários genes (KURMAN; SHIH, 2011). Os tipos II são cânceres pouco diferenciados e se desenvolvem rapidamente sem lesões precursoras conhecidas ou morfologicamente visíveis também apresentam alterações moleculares que impede expressão de BRCA através mutação no gene ou por metilação do promotor, são inclusos neste grupo os tumores como; carcinoma seroso de alto grau (moderado e mal diferenciado), tumores mesodérmicos malignos misturados (carcinosarcomas) e carcinoma indiferenciado (KURMAN; SHIH, 2011; MEINHOLD-HEERLEIN; HAUPTMANN, 2014).

Carcinoma seroso é o subtipo mais frequente encontrado nas neoplasias malignas epiteliais de ovário e 70% são diagnosticados em estádios avançados (estádios III e IV), onde são encontradas metástases em toda a cavidade peritoneal, geralmente com ascite (BAST; HENNESSY & MILLS, 2009). A quimioterapia à base de platina tem sido usada como terapia de primeira linha para estádios mais avançados, mas mesmo tendo as taxas de respostas globais iniciais responsivas, 15-20% das pacientes será resistente a este tratamento (CANNISTRA, 2004; LANE et al., 2015).

A ascite é um biofluido fascinante para a descoberta de novos biomarcadores, sua obtenção é fácil e minimamente invasiva, se comparado com uma cirurgia para a remoção do

tumor, podendo ser obtida através de uma punção (HANASH; PITTERI & FACA, 2008; LANE et al., 2015). Além disso, a concentração de citocinas é maior em ascite que no soro (GIUNTOLI et al., 2009), sendo um meio inflamatório rico em fatores de inflamação que promove a resistência a quimioterápicos. Estudos têm demonstrado níveis aumentados de fatores reguladores da inflamação em ascite, como IL-6, IL-6R, IL-8, IL-10, a leptina, a osteoprotegerina e uroquinase do ativador do plasminogênio (LANE et al., 2015; MATTE et al., 2012).

A IL-6 é um fator independente de pior prognóstico, pois contribui na progressão do câncer epitelial de ovário por inibição da apoptose, estimulando a angiogênese, aumentando a migração e invasão e estimulando a proliferação de células do tumor. Quando associada com o CA-125, pode auxiliar no diagnóstico dessa doença. A associação do CA-125 com a leptina pode ajudar a discriminar pacientes que são clinicamente resistentes ao tratamento inicial (LANE et al., 2015).

### **1.3.1 VEGF**

O principal fator que faz aumentar o líquido peritoneal é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); este fluido é um microambiente do tumor original, e não há dúvida de que a sua composição afeta o curso da doença. Os tumores com maiores índices de massa e ascite são encontrados nos carcinomas serosos (CHUDECKA-GŁAZ et al., 2015).

## 1.3.2 Perfil Th1

### 1.3.2.1 IL2

A interleucina (IL-2) é uma proteína  $\alpha$ -helicoidal de 4 feixes de 15 kDa produzida predominantemente por células T ativadas por antígeno, porém podem ser produzidas por células NK (natural killer) e células dendríticas ativadas, ligando-se ao receptor através de uma de três subunidades, IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) e  $\gamma$ c (CD132), que são encontrados em células T<sub>reg</sub> e recentemente em linfócitos T ativados por antígeno. Devido a sua potente atividade como fator de crescimento de células T in vitro, a IL-2 tem sido extensivamente estudada, porque esta atividade ofereceu um meio para impulsionar diretamente a imunidade, ou um alvo para antagonizar respostas indesejadas, rejeição de transplantes e doenças autoimunes. Embora a IL-2 tenha uma função como fator de crescimento em todos os subconjuntos de células T, há uma dependência maior de IL-2 por parte de células T<sub>reg</sub>. Este fato foi mostrado quando camundongos deficientes de IL-2 e seu receptor foram gerados, com isso estes animais desenvolveram uma síndrome autoimune letal, sistêmica, que foi atribuída à perda de T<sub>regs</sub> (DE-LEEuw et al., 2015; MALEK & CASTRO, 2010).

Em um estudo envolvendo camundongos com câncer de ovário avançado, observou-se que a sinalização de IL-2, embora dispensável para a expansão inicial de células T CD8<sup>+</sup>, foi essencial para respostas destas mesmas células no ambiente tumoral, sugerindo que a infusão de IL2 sistêmico pode ter efeitos antitumorais potentes como monoterapia ou em adjuvante a imunoterapia adotiva, pois em câncer de ovário, a administração intraperitoneal de IL-2 produziu uma taxa de 25% de resposta objetiva em ensaios clínicos inicial (DELEEuw et al., 2015; ROSENBERG, 2014).

### 1.3.2.2 *IL8*

A interleucina 8 é um membro da família das quimiocinas, por esta razão atrai e ativa granulócitos durante a reação imune, é expressa por diversas células normais e tumorais. Dessa forma, a IL8 é secretada por células tumorais, mas também por células mesoteliais, endoteliais e neutrófilos. Ultimamente tem sido relacionada como tendo um papel fundamental na patogênese do câncer devido à modulação da resposta tumoral ou reforçando a angiogênese. A IL-8 desempenha um papel no câncer de próstata, cólon e ovário entre outros, como também tem sido descrita como biomarcador de câncer de ovário em potencial, e também como um antígeno associado ao câncer de ovário identificado via SEREX (análise de serotipos de bibliotecas de expressão de DNA recombinante). O aumento da expressão de IL-8 tem sido demonstrado em ascite, soro e tecido tumoral de pacientes com câncer de ovário. Além disso, vários estudos demonstraram que a IL-8 se correlaciona com o prognóstico de pacientes com câncer de ovário (KOENSGEN et al., 2015).

Em estádios avançados de câncer do ovário, há um aumento na expressão de IL-8, que induz à sobrevivência celular do tumor, proliferação, angiogênese e metástase, correlacionando com um mau prognóstico (WANG et.,al 2012; SINGHAet.,al 2015).

### 1.3.2.3 *TNF- $\alpha$*

O TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa), quando encontrado em níveis elevados juntamente com a IL-6 e proteína C-reativa (PCR) é um fator preditivo para o desenvolvimento de câncer de ovário. Dados recentes sugerem que o efeito protetor da multiparidade limita-se a reduzir o risco de câncer de ovário que tem altos índices de TNF- $\alpha$  , comparados a nulíparas, as múltiparas tiveram cerca de 69%-79% menor risco de desenvolver carcinoma de ovário TNF- $\alpha$  positivo, o mesmo não se observa em tumores TNF- $\alpha$  negativo, já em mulheres fumantes

houve um aumento do risco de quase três vezes maior para desenvolver TNF- $\alpha$  negativo, mas o mesmo não foi observado em TNF- $\alpha$  positivo (GUPTA et al., 2016)

O TNF-  $\alpha$  desempenha um papel em etapas posteriores a carcinogênese como a ativação de NF-kB (fator nuclear kappa B), na transformação neoplásica, proliferação e sobrevivência do tumor. Em células do câncer de ovário, TNF-  $\alpha$  aumenta a migração celular e metástase através de NF-kB dependente da indução de IL-8, CXC tipo de receptor de quimiocina 4 (CXCR4), quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) e de adesão intercelular molécula-1 (TRABERT et al., 2014).

A expressão CD9 (é uma glicoproteína de superfície celular pertencente à família das tetraspaninas) é alta em carcinoma de ovário, especialmente no câncer de ovário de tipo seroso, CD9 pode funcionar como uma proteína anti apoptótica. TNF- $\alpha$  aumentou a multiplicação de células CD9/SKOV3 (SKOV3 células de adenocarcinoma de ovário de origem epitelial). O aumento da expressão de TNF- $\alpha$  é frequentemente encontrada em câncer de ovário, como também está relacionado com a carcinogênese do mesmo. Após a ligação do TNF- $\alpha$  no receptor de TNF- $\alpha$  1 (TNFR1), o NF-kB é transportado ao núcleo, onde ativa vários genes envolvidos no crescimento celular, diferenciação e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-8. Examinando o do complexo de TNF- $\alpha$  /TNFR1 em células que sobre expressam CD9 notou-se super expressão de CD9 levando a ativação consecutiva de NF-kB. Porém, a via de ativação de NF-kB/TNF- $\alpha$  ainda não foi elucidada, e necessita de mais estudos. No entanto, com a alta expressão de CD9, foi observado a elevação de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, que foram reduzidas por um anticorpo neutralizante de CD9, mostrando que CD9 regula a secreção destas citocinas, podendo ser um mecanismo para a tumorigenicidade mediada por CD9 (HWANG et al., 2012).

Kolomeyevskaya et al, em 2015, através de uma análise univariada, observou que os níveis de TNF- $\alpha$  foram associados com um período livre de recidiva após a cirurgia primária mais reduzida, e mostrado que altos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 em ascite são correlacionados com rápida recidiva de câncer epitelial de ovário avançado.

Tumores são capazes de ativar macrófagos, o que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, levando à formação de um microambiente inflamatório que promove o crescimento metastático (KIM et al., 2009). No entanto, estas mesmas citocinas podem ativar outras vias que aumentam a imunidade antitumoral, ilustrando as "duas faces" dos mediadores inflamatórios na progressão tumoral. Com isso, não é surpresa relatórios conflitantes em relação ao potencial de proteção contra o papel deletério de mediadores inflamatórios durante o câncer. Há décadas, o TNF- $\alpha$  já vem sendo mencionado no microambiente tumoral de câncer de ovário, sendo os macrófagos sua principal fonte (NAYLOR et al., 1993). Em estudos ex-vivo, o TNF- $\alpha$  exógeno estimulou células do tumor ovariano a produzir TNF- $\alpha$  e a se proliferar (WU et., al1993; KOLOMEYEVSKAYA et., al 2015).

A produção de TNF- $\alpha$  no microambiente do câncer de ovário aumenta o recrutamento de células mielóides dependente de IL-17, bem como promove o crescimento do mesmo em camundongos (CHARLES et al., 2009). Os mecanismos de ação do TNF- $\alpha$  no microambiente tumoral não são compreendida completamente, porém pode relacionar com um papel central numa rede de promoção tumoral autônoma de células do câncer, na estimulação de células epiteliais de transição mesenquimais nas células malignas, e mais danos no DNA de células malignas (YAN et., al 2006; CHARLES et., al 2009). Em outras células no microambiente tumoral as ações do TNF- $\alpha$  incluem a promoção da angiogênese (KULBE et al., 2007), perturbações da vigilância imunológica através da supressão das células T, inibição da

citotoxicidade de macrófagos ativados e indução de um fenótipo pró-angiogênico em monócitos recrutados (HAGEMANN et al., 2008).

TNFR2 é um receptor da superfamília do TNF. Os efeitos observados sobre este receptor se difere do TNFR1, pois não ativa as vias de morte celular, mas induz o crescimento celular, ou promover a ativação celular, migração, proliferação através das proteínas quinases ativadas por mitógeno e NF- $\kappa$ B, muitas vezes sendo associado com uma variedade de funções de regulação do sistema imunológico. Por outro lado, os efeitos de TNFR2 muitas vezes são anti-inflamatórios, este receptor está mais presente em células do sistema imune, diferentemente do TNFR1 que é expresso pela maioria das células (PIURA et al., 2014; SIEGMUND et al., 2016).

Alguns estudos têm relatado que T<sub>regs</sub> possuem uma população heterogênea de células com diferentes capacidades supressoras e migratórias, a expressão do receptor de TNFR2 em T<sub>regs</sub> está presente principalmente ligado a uma população T<sub>reg</sub> com alto poder supressivo. A expressão de TNFR2 em T<sub>regs</sub> é concretizada a partir da exposição a TNF em quadros de inflamação. No câncer de ovário, existe a presença de inflamação e de fatores inflamatórios como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, que estão relacionados com o risco aumentado desta neoplasia, pois níveis elevados de TNF são encontrados no soro e ascite de pacientes com câncer de ovário ( SAKAGUCHI et., al 2010; KULBE et., al 2012; GOVINDARAJ et., al 2013).

No entanto, em um estudo feito por Piura et. al. (2014), observou-se que a expressão de RNAm de TNFR2 foi maior em células neoplásicas ovarianas quando comparadas com células normais do ovário, e sua localização foi maior em células de carcinoma ovariano do que no estroma, sugerindo que TNF- $\alpha$  influencia na formação do carcinoma de ovário através de TNFR2. Portanto, o TNF- $\alpha$  e seus receptores TNFR1 e principalmente TNFR2, estão implicados na formação de carcinoma ovariano através de três mecanismos de ação: afetando a atividade ou comportamento de células de carcinoma de ovário, principalmente através de

TNFR2; modificando a morfologia celular, podendo permitir que estas células formem metástases; regulando uma rede constitutiva de outras citocinas (IL-6), fatores angiogênicos e MMPs (matriz metaloproteinase), que podem atuar de forma parácrina/autócrina, promovendo a tumorigênese do carcinoma ovariano.

### **1.3.3 Perfil Th2**

#### *1.3.3.1 IL-5*

A interleucina 5 é uma citocina do perfil Th2, produzida principalmente por linfócitos, como também por mastócitos, e eosinófilos. Esta interleucina originalmente apresentou função de estimular a produção de anticorpos pelas células B ativadas, porém recentemente tem-se tornado conhecida como um fator importante na diferenciação e proliferação de eosinófilos. Além disso, a IL-5 parece estar relacionada com a biologia do câncer, mas as evidências são contraditórias, há relato de níveis elevados de IL5 no soro e eosinofilia excessiva em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas de estadiamento avançado (STATHOPOULOS et al., 2010), como também um aumento da frequência de derrame pleural maligno induzido por adenocarcinoma (PANDIT et al., 2007; ZAYNAGETDINOV et al., 2015).

Em um estudo realizado por Jammal et al. (2016), a IL-5 foi mais frequentemente encontrada em tecidos, através de imunocoloração, em neoplasias benignas, tanto no epitélio como no estroma. Em outro estudo realizado por Giuntoli et al. (2009) apresentou níveis de IL-5 e de outras interleucinas (IL-2, IL-7, IL-17, PDGF-BB e a RANTES [*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*-CCL5]) com valores bastante diminuídos em ascite, quando comparados com o soro, no entanto a IL-5 foi a citocina com o menor nível apresentado em ascite (0,5 pg/mL), como também sua expressão foi a mais baixa no plasma (2,4 pg/mL), tornando assim a interleucina com a menor expressão em todo seu trabalho.

### 1.3.3.2 IL-6

Estudos clínicos têm correlacionado altos níveis de IL-6 sérico antes do tratamento com mau prognóstico em pacientes com diferentes tipos de câncer, como cabeça e carcinoma de células escamosas do pescoço, estádios II e III carcinoma gástrico, o câncer de próstata, carcinoma de células renais metastático, o câncer da mama metastático, e câncer de ovário. Níveis elevados de IL-6 em doentes com câncer pode ser devido ao aumento da expressão em células do sistema imunológico normais, como consequência de inflamação crônica, ou do estroma ou de células dentro de tumores (MICHALAKI et al.,2004; NEGRIER et al.,2004; DUFFY et al.,2008; LIAO et al.,2008; EICHTEN et al.,2016).

A IL-6, enquanto contribui para o desenvolvimento dos folículos nos ovários normais e a regulação da inflamação crônica, também pode estar envolvida na formação de um microambiente celular propício ao crescimento de células cancerígenas, como também sua proliferação, migração e sobrevivência. Pode ter efeitos diretos sobre a biologia das células do tumor, juntamente com a regulação dos componentes do sistema imunológico. Sua associação com a carcinogênese de câncer de ovário e progressão, bem com o aumento da sobrevivência das células de câncer de ovário, resistência à quimioterapia e invasividade, também têm sido relatados (MASOUMI-MOGHADDAM et al., 2015).

Em um estudo feito por Eitchen em 2016, mostrou que o aumento nos níveis de mediadores de inflamação, principalmente da IL-6, foi associado a ativação da STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) em tumores A431-V -Xenoinxertos de tumores humanos de células epidermóides resistentes a Aflibercept-, contribuindo na resistência ao Aflibercept (inibidor do fator de crescimento endotelial vascular -VEGF), como também evidenciou que o bloqueio da via IL-6/STAT3 com o anticorpo anti IL-6R (Sarilumab), que é específico para IL-6R humano, tornou este mesmo tumor mais sensível ao Aflibercept, como

também aumentou a atividade do Aflibercept em outro modelo de tumor (tumores próstata DU145), com forte atividade de IL-6/STAT3 endógena.

A alta expressão de IL-6 pode proporcionar um meio de sobrevivência a células tumorais durante o tratamento com Aflibercept com a ativação de STAT3, que dá suporte à sobrevivência de células tumorais quando há privação de VEGF e promove a quimiorresistência em células cancerosas expostas a hipóxia, como também pacientes com níveis séricos de IL-6 apresentam uma pior sobrevida do que aqueles com níveis baixos de IL-6, em um estudo onde foi usado Aflibercept como monoterapia em pacientes com câncer de ovário avançados e resistentes a platina em um estudo de fase II (YIN et al.,2006; SELVENDIRAN et al.,2009; TEW et al.,2014; EICHTEN et al.,2016).

#### *1.3.3.3 IL-10*

A interleucina 10 é uma citocina multifuncional produzida por linfócitos Th2 e pode inibir as respostas imunes celulares de macrófagos ativadas, importantes no controle homeostático de respostas imunes inata e celular. Também exerce efeitos diferentes sobre o sistema imunológico e está associada com a angiogênese, crescimento e a proliferação de células cancerosas em conjunto com a IL-8. A elevação de IL-10 e norepinefrina induzida pelo estresse crônico mostrou ter influência direta no crescimento de carcinoma de ovário em camundongos TGF- $\beta$ 1 (Factor de crescimento transformante beta 1), fator de crescimento endotelial vascular e IL-10 foram expressos em 100,74,69 e 54,96% respectivamente em tecidos malignos de câncer epitelial de ovário, sugerindo que desempenham papéis imunossupressores (LIU et al 2012; GAO, et al 2013; JAMMAL et al., 2014).

Células T<sub>regs</sub> (linfócitos T reguladores) convencional, como T CD4,CD25 e a expressão de FOXP3, são potentes reguladores da ativação de células T CD8 e inflamação tanto através

de supressão direta por citocinas inibitórias, tais como IL-10 e IL-35 e TGF- $\beta$  (Factor de crescimento transformante beta), e os mecanismos de supressão indiretos como subversão de células dendríticas em direção ao fenótipo mais imunorregulatório, diminuição da IL-2 no local, um crucial fator de crescimento e estabelecimento de um microambiente inibitório para o tumor. No câncer de ovário, o número de T<sub>regs</sub> é associado com estádios mais avançados, maior risco de morte, e supressão do perfil Th1 (CURIEL, et al., 2004; BARNETT et al., 2010; BU; et al., 2015).

## **2. JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

O câncer de ovário é uma malignidade constitui importante causa de morte por neoplasia ginecológica em mulheres, sendo a neoplasia ginecológica mais letal. Trata-se de uma das neoplasias mais difíceis de ser detectada precocemente. Apesar do melhor prognóstico em pacientes que apresentam doença localizada, avaliações retrospectivas demonstram que 50% dessas pacientes sofrem recorrência e vão a óbito, apesar da terapia apropriada. A maioria das pacientes se encontra em estadiamentos III e IV (FIGO-*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) no momento do diagnóstico. Nesses casos, a principal estratégia terapêutica é a cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia. Apesar dos esquemas quimioterápicos derivados da platina e, mais recentemente, dos taxanos, os resultados do tratamento não têm obtido melhora importante nas últimas décadas. Nos estadiamentos I e II, a sobrevida em 5 anos varia de 73 a 98%, enquanto que nos estadiamentos III e IV, essa percentagem é de apenas 17 a 69% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Portanto, são necessárias novas estratégias de diagnóstico e tratamento do câncer de ovário, e a descoberta de novos fatores prognósticos e marcadores de diferenciação entre neoplasias benignas e malignas são importantes para guiar melhor o tratamento.

## **3. OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

1. Verificar se há diferenças na dosagem de citocinas (padrão TH1: IL-2, IL-8, e TNF- $\alpha$ ; padrão TH2: IL-5, IL-6 e IL-10) no lavado peritoneal entre lesões não neoplásicas, neoplasias benignas e malignas primárias de ovário.

2. Relacionar a dosagem dessas citocinas do lavado peritoneal ou ascite com parâmetros clínicos e patológicos de pacientes com neoplasia maligna primária de ovário.

## **4. HIPÓTESE**

#### **4 HIPÓTESE**

Há um aumento dos níveis de citocinas em neoplasias malignas, quando comparadas com neoplasias benignas e tumores não neoplásicos, e uma produção maior de um perfil de citocinas relacionado com fatores de pior prognóstico em câncer de ovário.

# **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 5 MATERIAIS E MÉTODO

Foram avaliadas de forma prospectiva as pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia / Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, com indicação de tratamento cirúrgico. Os critérios utilizados para a indicação de cirurgia foram: cistos anecóicos com diâmetro máximo menor que 7cm, com persistência da alteração por mais que 6 meses e marcadores tumorais normais; marcadores tumorais alterados; cistos anecóicos com diâmetro máximo maior ou igual a 7cm; massas ovarianas com conteúdo sólido, presença de vegetação intracística, septos grossos, dois ou mais septos finos; bilateralidade; presença de ascite; color Doppler com índice de resistência menor ou igual a 0,4 (Murta et al., 2004; Murta & Nomelini, 2006).

Um total de 117 pacientes foram avaliadas, constituindo três grupos: o primeiro grupo lesões não neoplásicas de ovário, composto por 14 pacientes, o segundo grupo de lesões benignas, composto de 74 pacientes, e o terceiro grupo de lesão maligna de ovário, composto por 29 pacientes. Todas as pacientes foram acompanhadas no pré-operatório para a coleta do lavado peritoneal ou ascite no intraoperatório e revisados os resultados anatomopatológicos em parafina.

Foram anotados em um banco de dados específico para o estudo os seguintes dados dos prontuários: idade, paridade, *status* hormonal, tipo histológico, e no caso de tumores malignos, grau histológico, estadiamento (FIGO), e o resultados dos ensaios de cada citocina dosada.

Os valores de RNL e RPL foram obtidos através da divisão do número absoluto de neutrófilos e plaquetas pelo número absoluto de linfócitos, respectivamente. Como valor de corte foi usado 4 para RNL (DIRICAN et al., 2015; KOH et al., 2015), e 200 para RPL. Em

relação aos tumores epiteliais, foram considerados tumores ovarianos do tipo I os tumores *borderline* serosos, carcinomas serosos de baixo grau, e carcinomas mucinosos, endometrióides e de células claras. Foram considerados tumores do tipo II os carcinomas serosos de alto grau, tumores mesodérmicos malignos mistos (carcinosarcomas) e indiferenciados (ALI-FEHMI et al., 2011; KURMAN; SHIH, 2011). Na classificação por grau histológico, os tumores de células da granulosa foram incluídos juntamente com os tumores epiteliais de grau histológico 1.

Para a avaliação da sobrevida livre de doença (SLD), os grupos foram divididos em SLD  $\leq 24$  meses e SLD  $> 24$  meses. Para a avaliação da sobrevida global (SG), os grupos foram divididos em SG  $\leq 60$  meses e SG  $> 60$  meses. As pacientes que perderam o seguimento, ou cujos dados estavam incompletos no prontuário foram excluídas para essa avaliação.

Foi realizada a captura de anticorpos através da técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay- ensaio de imunoabsorção enzimática) em amostras de lavado peritoneal (ou ascite, se presente em casos neoplasias malignas) para a dosagem das citocinas.

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

## 5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Diagnóstico de tumor não neoplásico de ovário, neoplasia benigna de ovário, ou neoplasia maligna epitelial primária de ovário.

## 5.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão foram; torção do pedículo anexial, neoplasia maligna secundária de ovário (metástase), doenças que levam a imunossupressão, medicações imunossupressoras, tratamento anti neoplásico prévio e recidiva.

### 5.3 COLETA DO LÍQUIDO PERITONEAL

Em todas as cirurgias por tumores ovarianos foi coletado o líquido peritoneal através da realização do lavado peritoneal, exceto na presença de ascite, em que foi realizada a coleta direta da mesma. Para o lavado peritoneal, realizou a injeção de 100ml de soro fisiológico 0,9% na cavidade peritoneal e retirou-se 20ml deste lavado. O líquido peritoneal e a ascite foram armazenados em frascos estéreis, em caixa de isopor com gelo, para o transporte até o laboratório do IPON. O lavado peritoneal foi centrifugado (2000 rpm, por 10 min) e o sobrenadante coletado, e estocado (- 20°C) até a dosagem de citocinas.

### 5.4 ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

A avaliação anatomopatológica e o estadiamento dos casos foram realizados de acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* – FIGO. Dosagem de citocinas

### 5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

As concentrações IL-2, IL-8 e TNF- $\alpha$  (perfil TH1) e de IL-5, IL-6 e IL-10 (perfil TH2) foram quantificadas no sobrenadante das amostras de lavado peritoneal por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As concentrações das citocinas foram obtidas a partir do lavado peritoneal, com resultados expressos em pg/mL.

Para a captura de anticorpos (técnica de ELISA), foram utilizadas placas de 96 poços revestidas com 50  $\mu$ L/poço do anticorpo específico para cada uma das citocinas citadas, diluídos (1 a 3  $\mu$ g/ $\mu$ L) em solução tampão de ligação (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e incubados por 16-24 horas em temperatura de 4°C. As placas então foram lavadas três vezes com PBS/Tween 20 a 0,05%

e a ligação não específica foi bloqueada por PBS/BSA 1% (100 µL/poço), incubando por 2 horas a 37°C.

As amostras e a curva padrão (concentrações conhecidas de citocinas) foram colocadas nas placas (50 µL/poço) e incubadas por 16-24 horas em uma temperatura de 4°C. Para a curva padrão foram utilizados anticorpos recombinantes humanos previamente diluídos em PBS/Tween 20 a 0,05% respeitando as dosagens de 2,5 a 10 mg/mL, respectivamente.

As placas foram lavadas e, em seguida, foi adicionado anticorpo anti-citocina biotilado (0,5 a 1 mg/mL) diluído em tampão de bloqueio (PBS/BSA 1%). Após 1 hora de incubação a 37°C as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 e 100 µL/poço do conjugado avidina-peroxidase, previamente diluído em tampão de bloqueio (1:5000), foi adicionado.

A placa foi novamente incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período as placas foram lavadas e, em seguida, foi realizada a reação de coloração adicionando-se 100 µL do substrato o-fenilenediamina dihidroclorato-OPD. As placas foram então incubadas novamente em temperatura ambiente por mais 15 a 20 minutos.

A reação foi então interrompida adicionando 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M, e a absorbância medida a 490 nm em leitor de placa de ELISA. Os resultados foram expressos em picogramas/mililitro (pg/mL) de cada citocina dosada por mililitro do sobrenadante do líquido intracístico (BENJAMIM et al, 2000).

## 5.6 DADOS ANALISADOS

Os dados das pacientes encontrados nos prontuários foram anotados em um banco de dados específico para o estudo contendo: idade, tipo histológico, grau histológico, estadiamento (FIGO), classificação em tipo I e tipo II de câncer de ovário (no caso de tumores epiteliais), sobrevida livre de doença, sobrevida global, marcadores tumorais pré-operatórios (CA 125, CA

15.3, CA 19.9), níveis pré-operatórios de hemoglobina, relação neutrófilo-linfócito (RNL), relação plaqueta-linfócito (RPL), e os níveis de cada interleucina estudada.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo *GraphPad Instat software*. Os resultados foram expressos em medianas e percentis 25 e 75. A partir do resultado entre os grupos não pareados de lesões não neoplásicas, benignas e malignas foram comparados através de teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As comparações de citocinas com fatores prognósticos foram utilizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

## 6 RESULTADOS

A mediana de idade de todas as pacientes foi de 52 anos. No grupo de tumores não neoplásicos, a mediana de faixa etária foi de 45 anos (34-87 anos), no grupo de neoplasias benignas foi de 50 anos (11-77), e no grupo de neoplasias malignas foi de 56 anos (14-82). A paridade mediana geral foi de 2 partos (0-9 partos). Das 133 pacientes, n (47%) estavam no menacme e n (62%) pacientes estavam na menopausa. Onze (36,7%) do grupo de pacientes do grupo maligno foram a óbito (tabela 1).

**Tabela 1:** Características dos três grupos de pacientes comparados no estudo.

	Lesões não neoplásicas n= 14 (%)		Lesões neoplásicas benignas n=74 (%)		Lesões neoplasias malignas n= 29 (%)	
Idade (mediana em anos)	45 (34-87)	--	50 (11-77)	--	56 (14-82)	--
Paridade (mediana)	2 (0-5)	--	2 (0-13)	--	2 (0-11)	--
Status hormonal: Menacme	8	57,1	45	60,8	10	34,5
Status hormonal: Menopausa	6	42,8	29	39,2	19	65,5
Óbito	--	0	--	0	10	34,5

Fonte: O autor

Os subtipos histológicos do grupo de Tumores Não Neoplásicos de ovário estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Classificação histológica das lesões não neoplásicas de ovário

	Tumores não neoplásicos de ovário n = 14	
	n	%
Cisto simples	8	57,14
Cisto teca-luteínico	3	35,71
Cisto folicular	1	21,42
Cisto hemorrágico	1	7,14
Hematoma de corpo lúteo	1	7,14

Fonte: O autor

Os subtipos histológicos do grupo de Neoplasias Benignas estão descritos na tabela 3

**Tabela 3:** Classificação histológica das Lesões Neoplasias Benignas

Neoplasias Benignas		
n = 74		
	n	%
Cistoadenoma Seroso	24	32,43
Teratoma cístico Maduro	23	31,08
Cistoadenoma Mucinoso	22	29,72
Tumor de Brenner	2	2,70
Cistoadenoma Papilífero Seroso	1	1,35
Fibroma	1	1,35
Fibrotecoma	1	1,35

Fonte: O autor

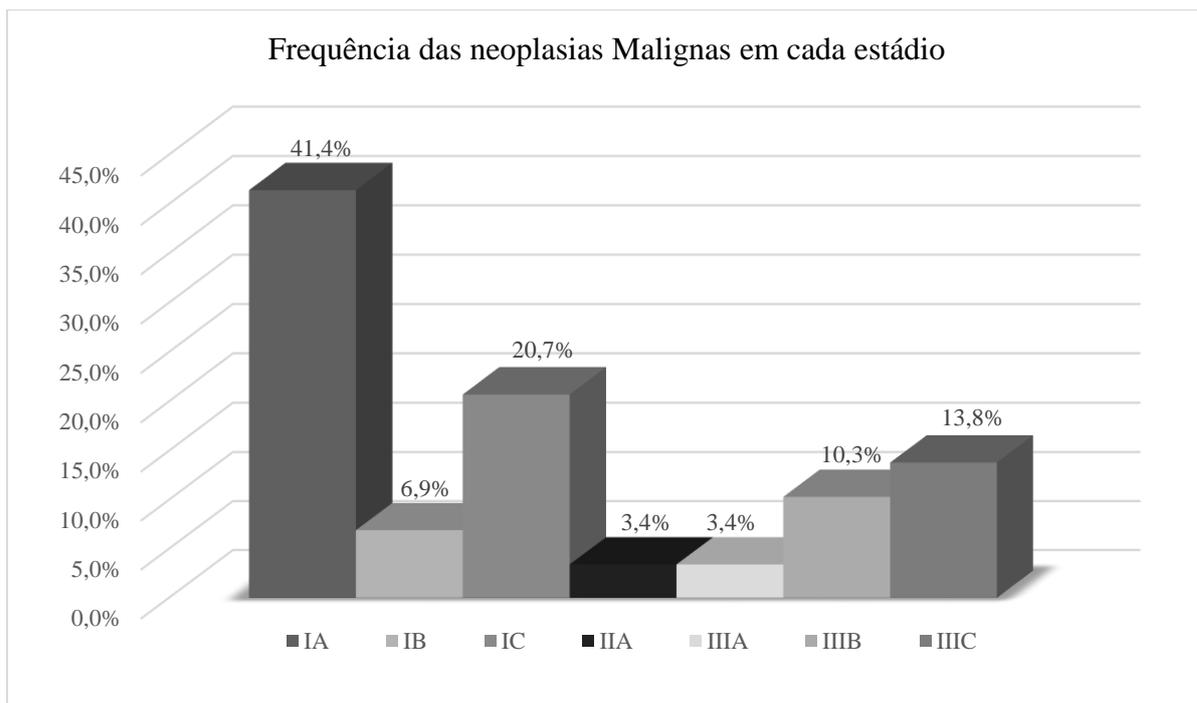
Os subtipos histológicos do grupo de Neoplasias Malignas estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4:** Classificação histológica das Neoplasias Malignas

Neoplasias Malignas		
n = 29		
	n	%
Cistoadenoma Mucinoso Borderline	6	20,68
Cistoadenoma Papilífero Seroso	5	17,24
Tumor de Células Da Granulosa	5	17,24
Carcinoma de Células Claras	2	6,89
Disgeminoma	1	3,44
Adenocarcinoma Endometrioide	1	3,44
Adenocarcinoma Seroso	1	3,44
Neoplasia de Alto Grau	1	3,44
Tumor de Células De Sertoli	1	3,44
Tumor de Células Germinativas	1	3,44
Tumor de Seio Endodérmico	1	3,44
Teratoma Imaturo	1	3,44
Tumor Seroso Borderline	1	3,44

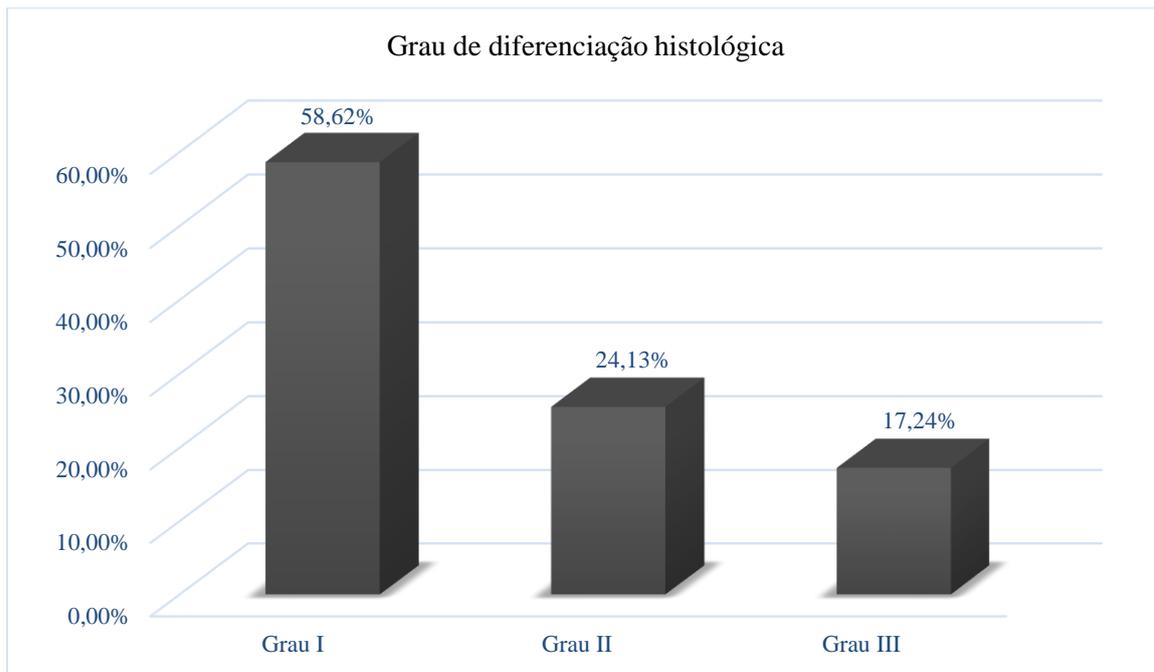
Fonte: O autor

O estadiamento das neoplasias malignas segundo a FIGO foram: IA n = 12 (41,4%), IB n = 2 (6,9%), IC n = 6 (20,7%), IIA n = 1 (3,4%), IIB n = 0, IIIA n = 1 (3,4%), IIIB n = 3 (10,3%), IIIC n = 4 (13,8%) e em nosso estudo não ocorreu diagnóstico de nenhuma paciente em estágio IV (Figura 1).



**Figura 1:** Frequência (%) em cada estadiamento para câncer ovariano segundo os critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) nas pacientes com Neoplasia Maligna

O grau de diferenciação histológica das neoplasias malignas foi dividido em grau 1 (bem diferenciado) grau 2 (moderadamente diferenciado) e grau 3 (indiferenciado); Grau 1 n=17 (58,62%), grau 2 n=7 (24,13%) e grau 3 n=5 (17,24%) (figura 2).

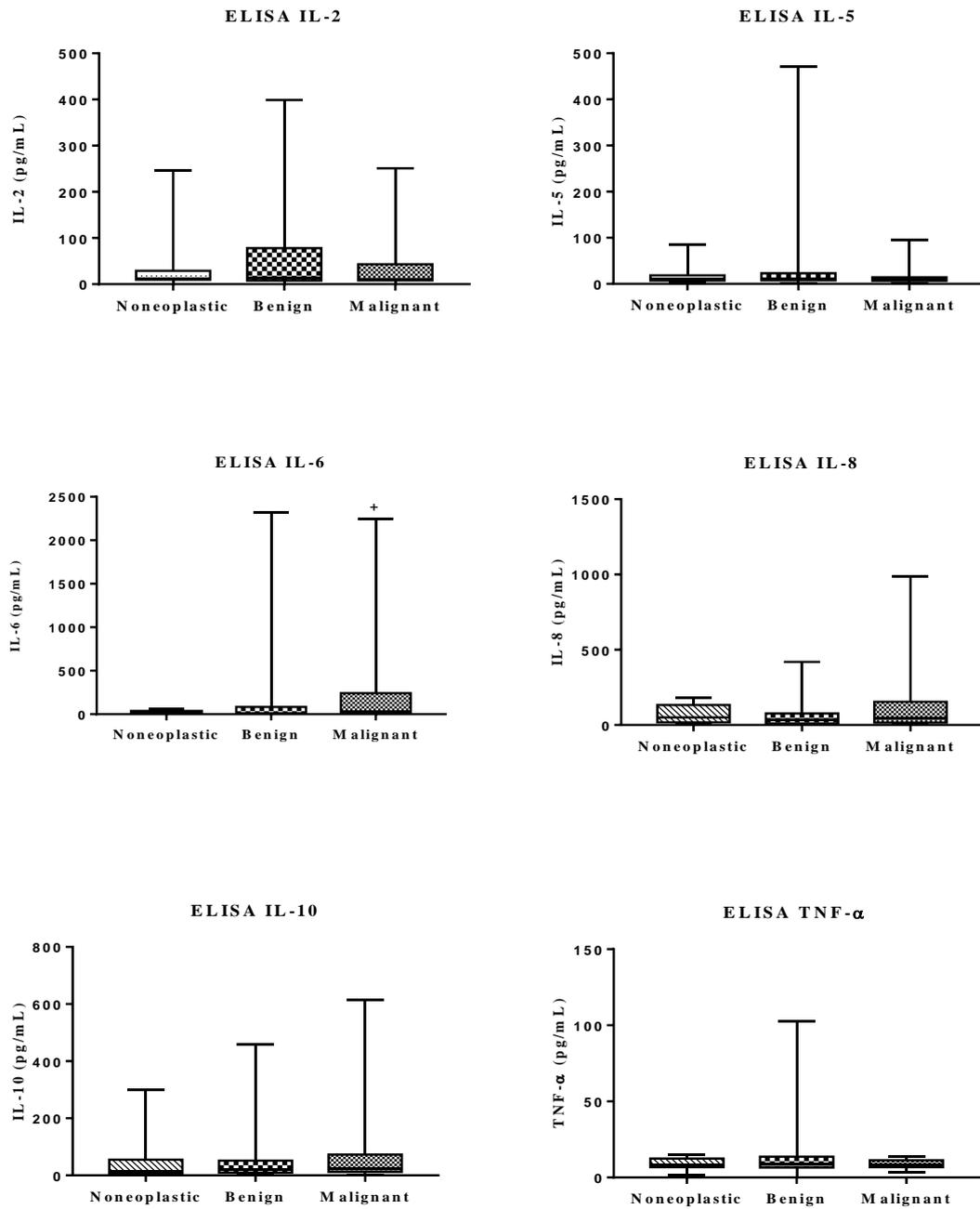


Fonte: O autor

**Figura 2:** Grau de diferenciação histológica das neoplasias malignas

## 6.1 RELAÇÃO DAS CITOCINAS ENTRE OS GRUPOS

Na avaliação dos níveis da citocinas entres os grupos de não neoplásicos, neoplasias benignas e neoplasias malignas, valores mais elevados de IL-6 foram encontrados em neoplasias malignas, quando comparados com tumores não neoplásicos ( $p=0.0241$ ). Não houve significância estatística com as demais interleucinas estudadas (figura 3).



**Figura 3:** Relação das citocinas (mediana, percentis 25 e 75) entre os grupos não neoplásicos, benignos e malignos (Kruskall-Wallis, com pós-teste de Dunn). \* $p=0.0241$  comparando-se com o grupo não neoplásicos.

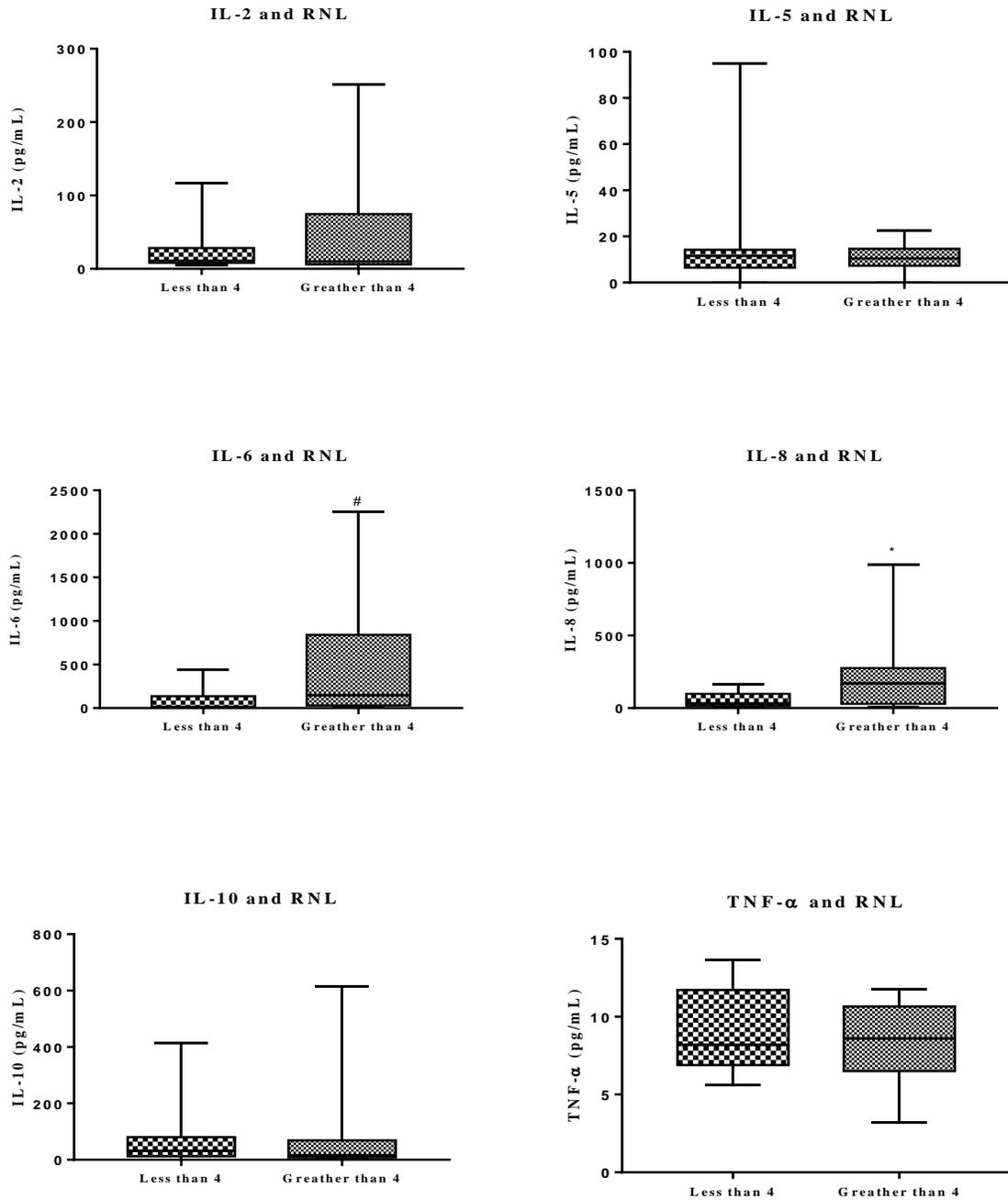
## 6.2 RELAÇÃO CITOCINAS COM FATORES PROGNÓSTICOS LABORATORIAIS

**Tabela 5:** Relação das citocinas (mediana, percentil 25 e percentil 75) e fatores prognósticos laboratoriais em neoplasias malignas de ovário.

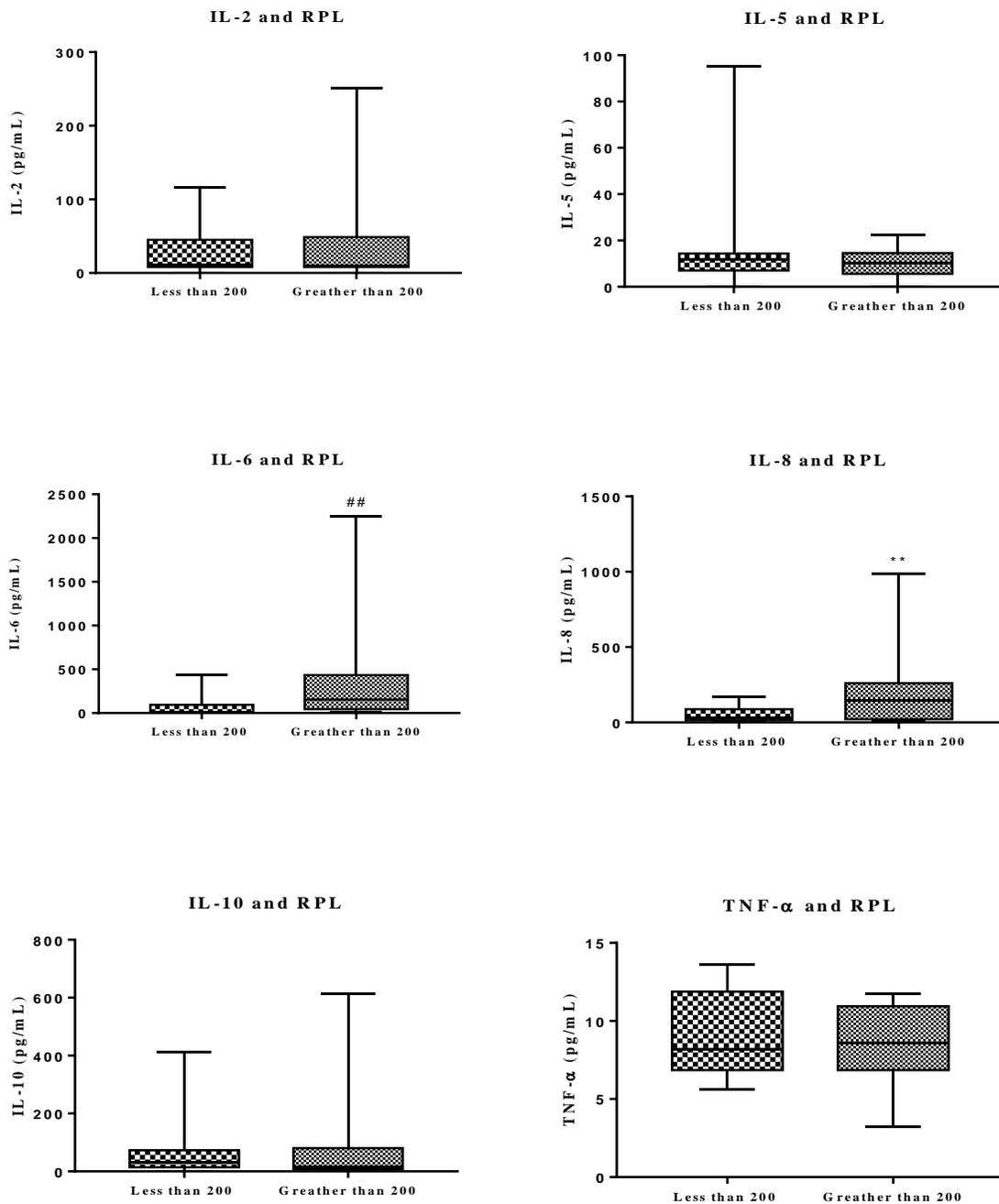
		<b>IL2</b>	<b>IL5</b>	<b>IL6</b>	<b>IL8</b>	<b>IL10</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>RNL</b>	≤ 4 (n=19)	11.2 (8.4-25.2)	11.5 (7.0-13.6)	14.3 (7.0-114.8)	33.1 (16.0-87.8)	31.4 (13.4-73.2)	8.2 (7.1-11.7)
	> 4 (n=10)	10.3 (8.3-48.3)	10.5 (7.6-14.2)	151.6 (39.3-420.5) <sup>#</sup>	173.4 (57.6-260.5) <sup>*</sup>	15.9 (10.9-54.3)	8.6 (6.9-10.5)
<b>RPL</b>	≤ 200(n=17)	11.2 (8.7-28.3)	11.8 (7.3-13.8)	9.4 (6.1-54.3)	33.1 (14.9-77.2)	31.4 (14.4-66.3)	8.2 (6.9-11.7)
	> 200 (n=12)	10.3 (8.0-31.0)	10.1 (4.7-13.6)	154.2 (66.9-418.2) <sup>##</sup>	145.3 (30.8-248.8) <sup>**</sup>	15.9 (8.9-69.2)	8.6 (7.0-10.7)
<b>CA125 (U/ml)</b>	≤ 35(n=15)	10,8 (8.9-45.2)	11.5 (7.7-13.9)	9.1 (7.0-29.8)	32.5 (11.8-93.0)	17.1 (11.7-66.3)	8.6 (7.1-11.1)
	> 35 (n=14)	11,1 (8.0-21.6)	10.7 (7.0-14.0)	166.9 (60.2-432.4) <sup>###</sup>	113.7 (36.9-173.4) <sup>***</sup>	29.2 (13.8-69.2)	7.8 (6.9-10.9)
<b>CA15.3 (U/ml)</b>	≤ 31 (n=22)	10,3 (8.8-26.2)	10.7 (6.7-13.3)	18.9 (7.9-196.2)	46.0 (16.7-141.8)	31.6 (15.3-82.7) <sup>×</sup>	8.4 (7.2-10.9)
	> 31 (n=7)	20,2 (3.5-60.5)	12.7 (8.9-15.3)	92.5 (66.1-243.1)	48.7 (29.3-151.1)	12.4 (8.0-18.9)	10.1 (6.0-11.1)
<b>CA19.9 (U/ml)</b>	≤ 35 (n=22)	10,3 (8.0-26.3)	10.9 (8.3-11.9)	20.7 (7.9-215.2)	42.0 (14.0-137.9)	21.7 (12.9-65.6)	8.0 (6.9-11.0)
	> 35 (n=7)	12,4 (9.2-60.5)	11.0 (6.5-14.2)	87.2 (66.1-230.5)	124.4 (37.3-151.2)	26.9 (10.1-58.6)	8.6 (7.5-10.30)
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	≤ 12 (n=12)	10,3 (8.0-68.0)	9.9 (9.8-14.7)	230.5 (49.3-418.2) <sup>####</sup>	143.0 (32.3-248.8)	30.2 (14.6-69.2)	9.5 (7.3-11.3)
	> 12 (n=17)	11,2 (8.7-22.1)	12.0 (3.2-8.3)	9.4 (6.1-77.8)	33.1 (14.9-98.4)	19.8 (11.7-66.3)	7.4 (6.8-10.1)

<sup>#</sup>p=0.0311 comparado com RNL≤4; <sup>##</sup>p=0.0051 comparado com RPL≤ 200; <sup>###</sup>p=0.0019 comparado com CA-125 ≤35 U/mL; <sup>####</sup>p=0.0027 comparado com hemoglobina ≥ 12g/dL; <sup>\*</sup>p=0.0241 comparado com RNL≤ 4; <sup>\*\*</sup>p=0.0425comparado com RPL≤ 200; <sup>\*\*\*</sup> p=0.0291 comparado com CA-125 ≤35 U/mL; <sup>+</sup> p=0,03 comparado com glicose ≤100 mg/dL; <sup>×</sup>p=0,0461 comparado com CA-15.3 ≤31 U.

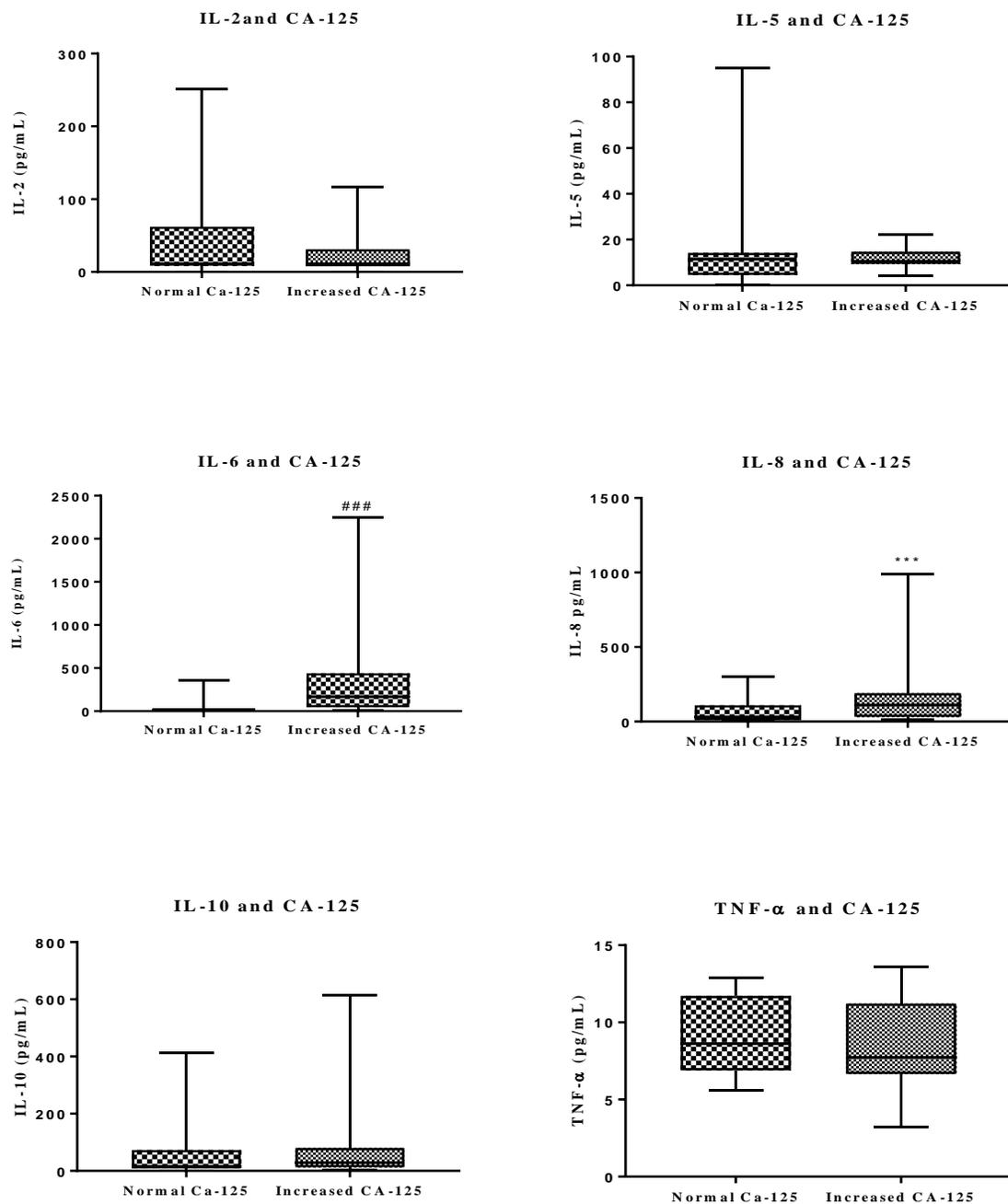
Níveis mais elevados de IL-6 e IL-8 tiveram associação com RNL > 4 ( $p=0,0311$  e  $p=0,0241$ , respectivamente). Não houve significância estatísticas com outras citocinas estudadas em relação a esse parâmetro (Figura 4 e tabela 5).



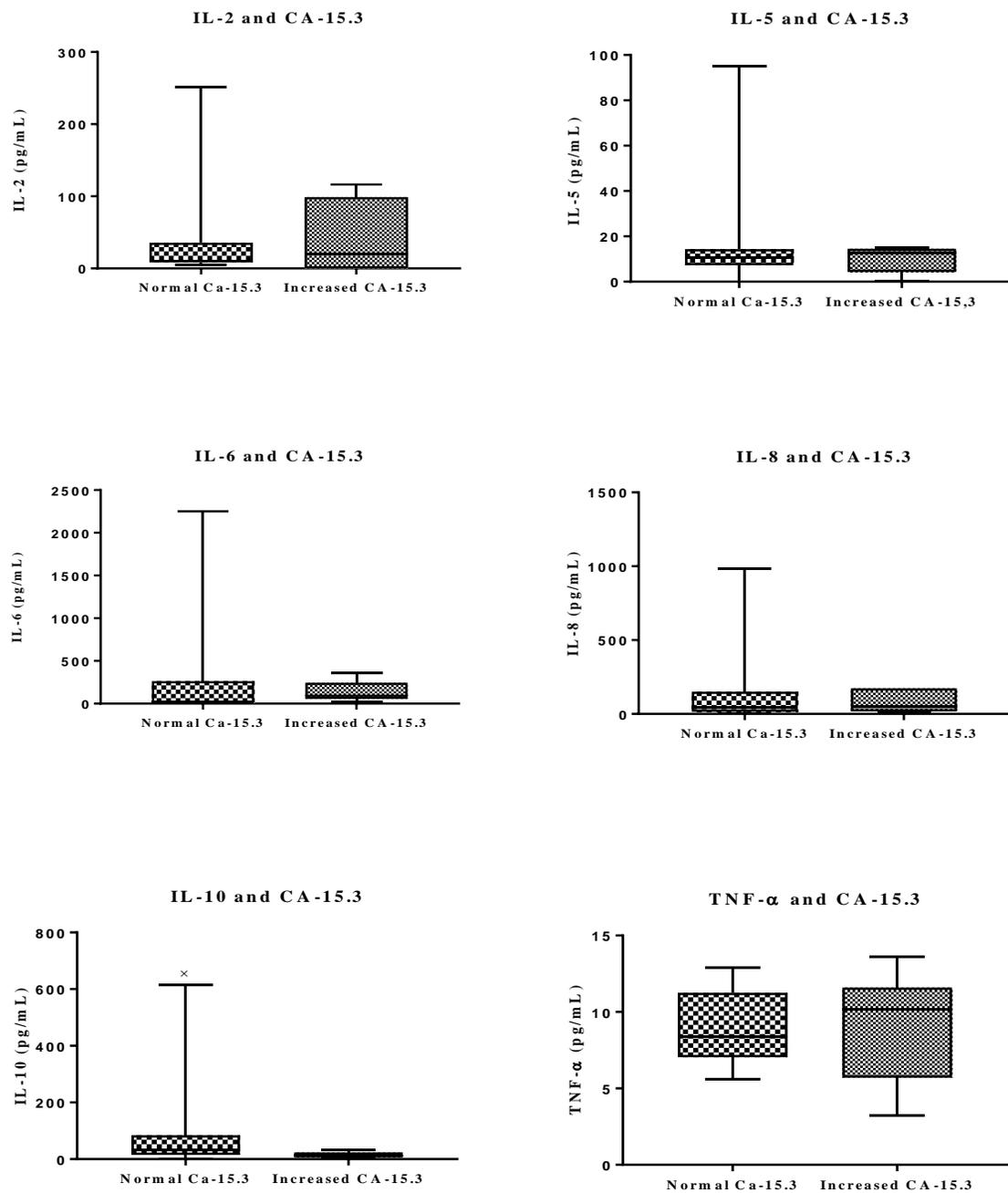
**Figura 4:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) em relação a RNL < 4 e RNL > 4. # $p=0,0311$  e \*\* $p=0.0241$ , comparados com RNL<4



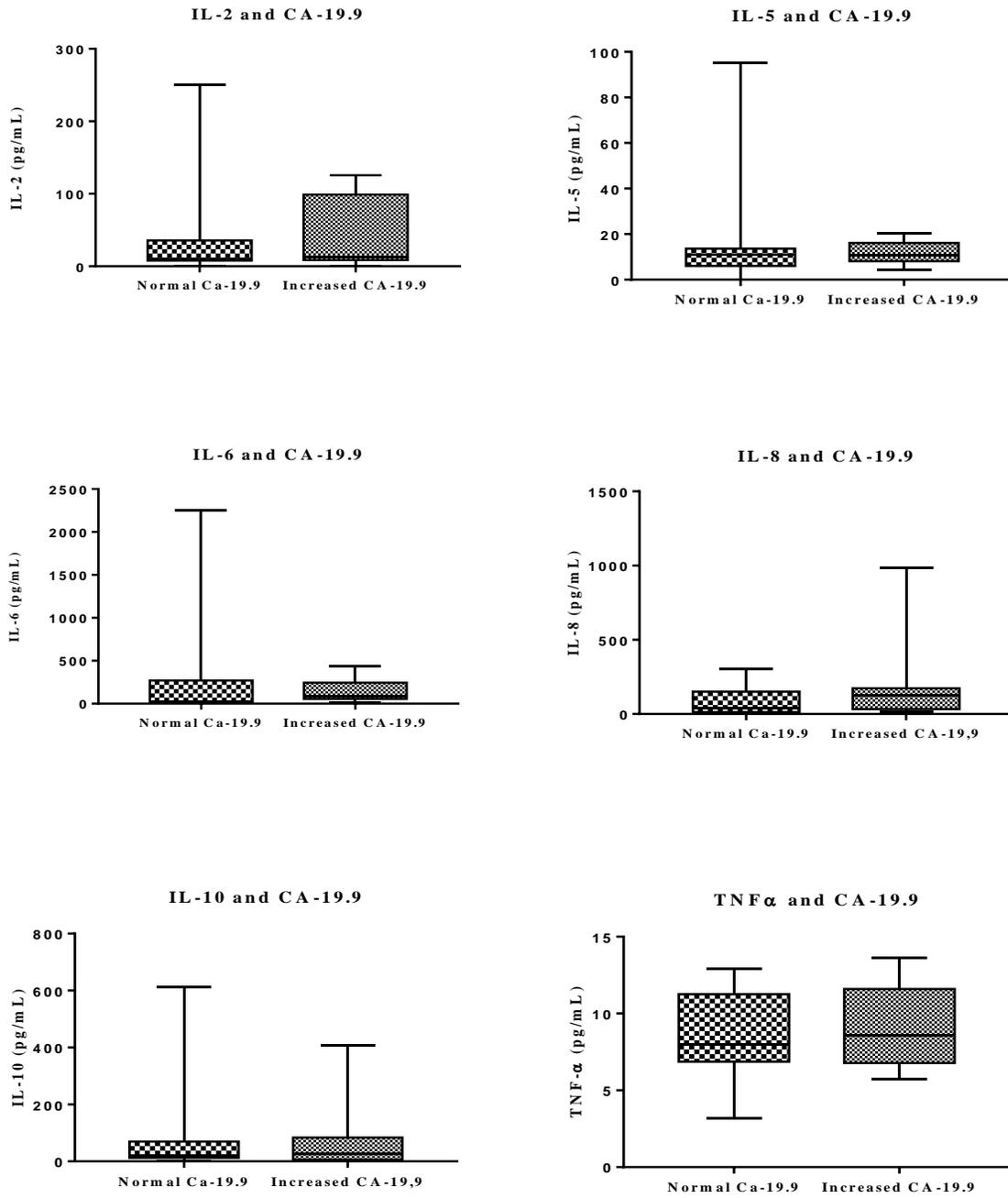
**Figura 5:** comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n=29) em relação a RPL <200 e RPL>200. ## IL-6 p= 0,0051 e \*\*IL-8 p= 0,0426 comparados com RPL<200



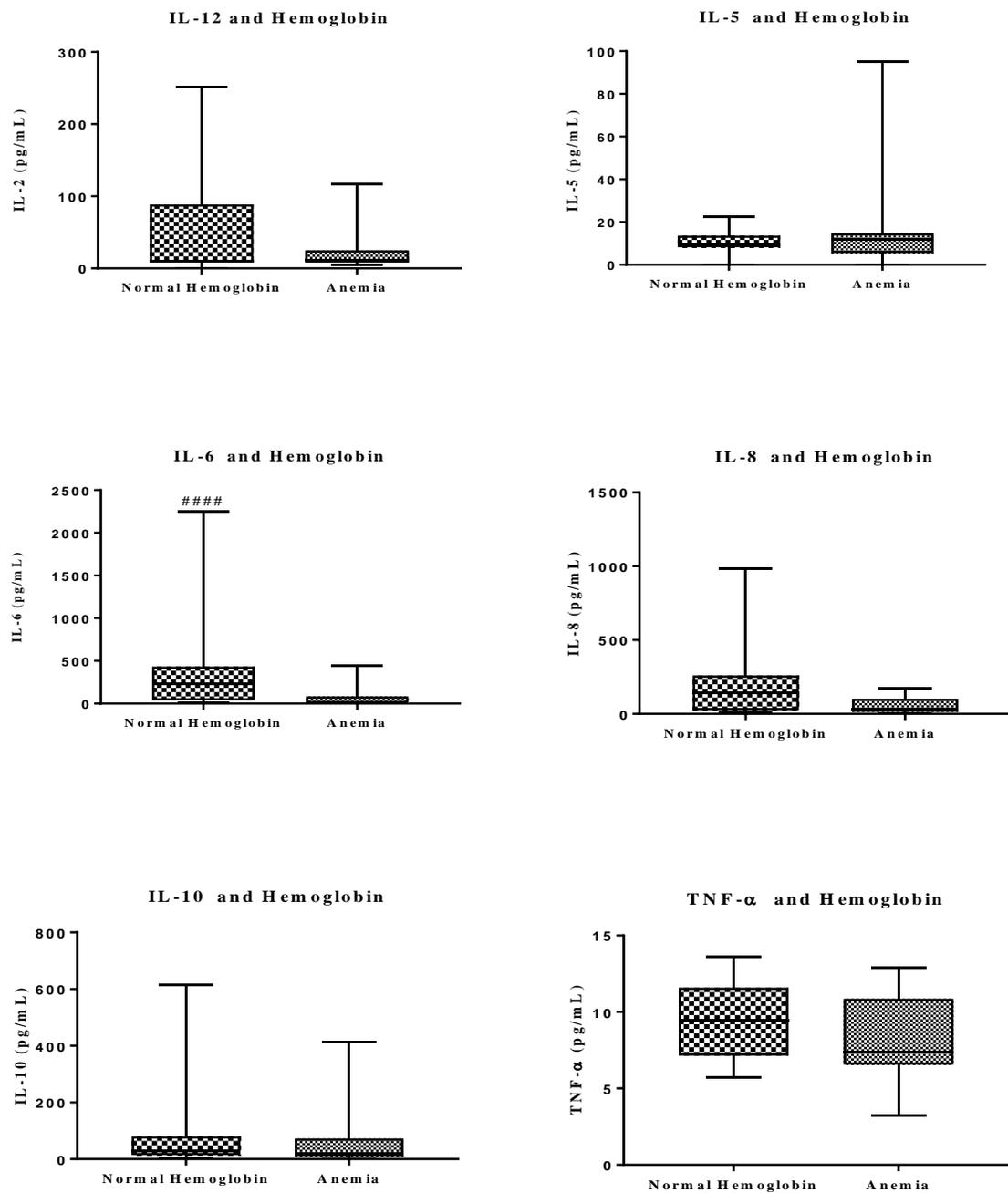
**Figura 6:** comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n=29) em relação a CA 125 <35 U/ml e CA125 >35 U/ml. ###IL-6 p=0,0019 e \*\*\*IL-8 p=0.0291 comparados com CA 125 normal.



**Figura 7:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n=29) em relação a CA 15-3  $\leq$ 31 U/ml e CA15-3  $>$ 31 U/ml. \*IL-10 p= 0,0481 comparado com CA 15.3  $>$ 31.



**Figura 8:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n=29) em relação CA-19.9  $\leq 35$  U/ml CA 19.9  $> 35$  U/ml.



**Figura 9:** Comparação dos níveis de citocinas (mediana, percentil 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n=29) em relação a hemoglobina <12 g/dL e hemoglobina >12g/dL. ####  $p=0.0027$ , comparado com hemoglobina <12.

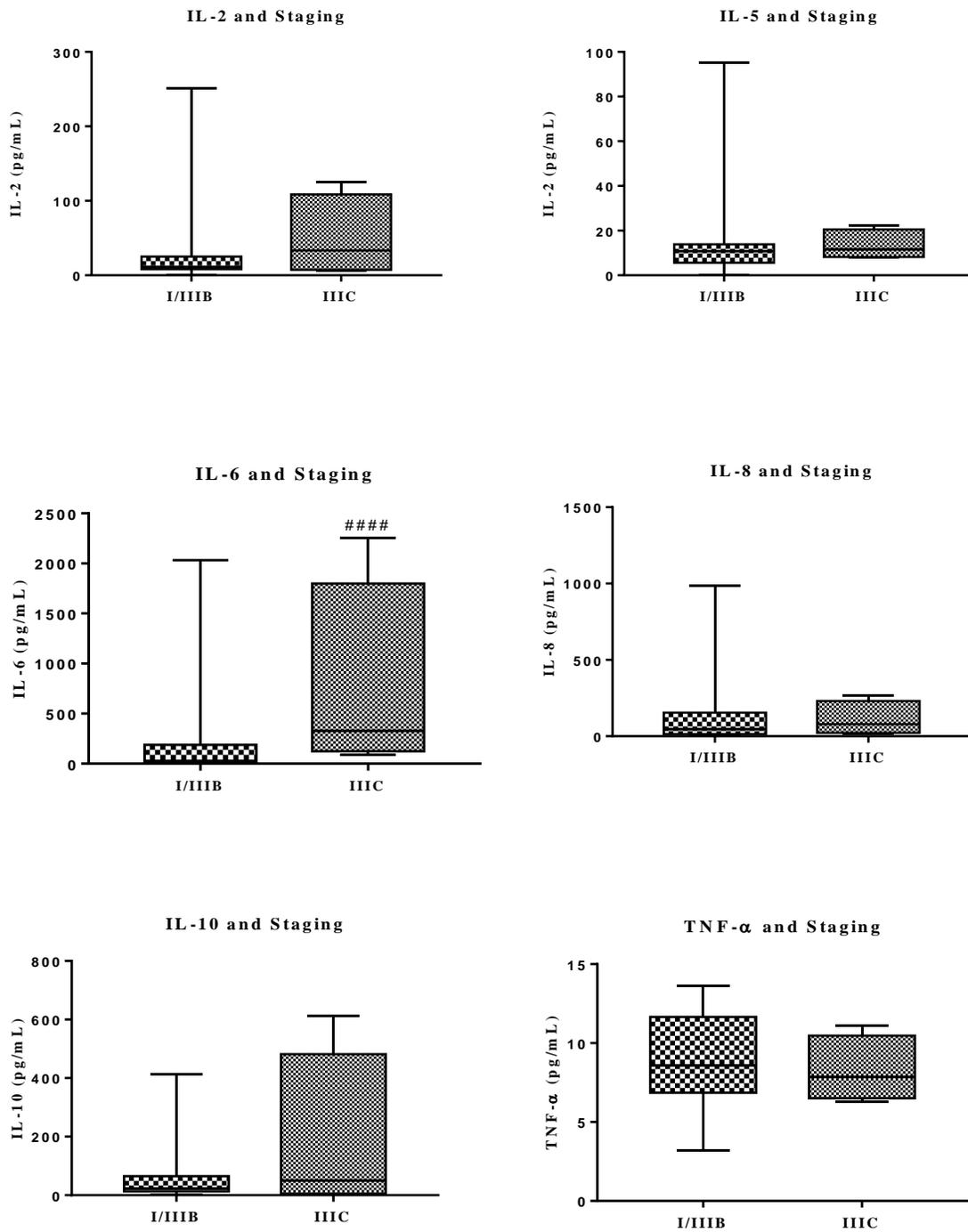
### 6.3 RELAÇÃO CITOCINAS COM FATORES PROGNÓSTICOS CLÍNICOS.

Foram avaliados as citocinas do grupo de neoplasias malignas e sua relação estadiamentos, grau histológico e tipo e os resultados são apresentados na tabela abaixo.

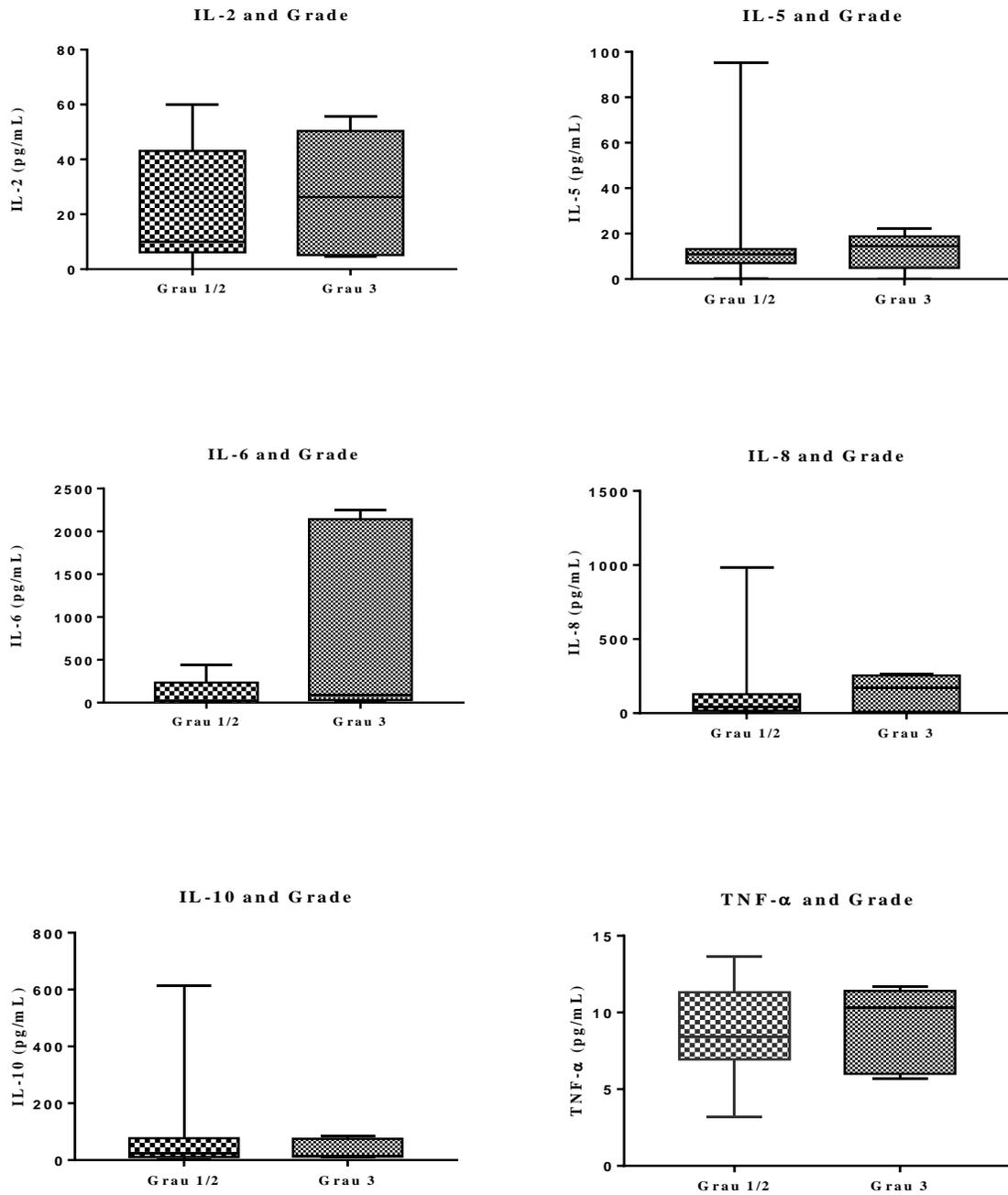
**Tabela 6:** Relação das citocinas (mediana, percentil 25 e percentil 75) e fatores prognósticos em neoplasias malignas de ovário.

		<b>IL2</b>	<b>IL5</b>	<b>IL6</b>	<b>IL8</b>	<b>IL10</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>Estadio</b>	I-III (n=25)	10.8 (8.0-22.1)	11.0 (6.5-13.5)	23.4 (8.0-137.0)	48.7 (14.9-147.6)	23.5(14.3-63.5)	8.6 (7.3-11.8)
	IIIC (n=4)	33.5 (8.6-74.7)	11.8 (8.3-17.0)	328.9 (185.1-894.2)#####	79.9 (30.8-159.9)	49.3 (10.0-218.2)	7.4 (6.2-10.4)
<b>Grau</b>	1 e 2(n=24)	10.1 (8.0-43.6)	10.3 (7.6-12.7)	24.3 (8.3-222.2)	45.1 (20.2-125.5)	25.2 (13.3-69.8)	8.4 (7.0-10.8)
	3 (n=6)	26.3 (5.3-41.9)	12.6 (7.9-14.7)	92.5 (54.3-2032.9)	173.5 (17.1-242.9)	14.3 (12.4-63.5)	10.3 (6.3-11.1)
<b>Tipo</b>	1 (n=13)	9.5 (4.6-43.6)	12.0 (7.9-14.5)	77.8 (8.4-215.9)	48.7 (17.1-129.0)	26.9 (14.3-33.6)	8.2 (6.3-10.1)
	2 (n=6)	6.2 (5.5-8.3)	11.3 (6.9-18.7)	182.8 (9.2-420.5)	34.2 (32.6-82.6)	51.7 (9.6-85.6)	8.2 (7.3-10.1)
<b>SLD (meses)</b>	≤ 24 (n=9)	9.7 (9.1-22.1)	9.9 (8.1-11.8)	215.9 (77.8-442.0)#####	129.0 (35.4-242.9)	26.9 (6.2-66.3)	8.6 (6.8-10.5)
	> 24 (n=18)	11.0 (7.7-26.2)	11.8 (6.7-14.8)	18.9 (7.9-83.0)	40.9 (13.4-106.2)	20.3 (14.3-69.4)	8.4 (7.0-11.3)
<b>SG (meses)</b>	≤ 60(n=18)	18.3 (9.1-60.9)	11.3 (8.7-13.3)	66.1 (19.3-327.4)	42.0 (15.2-170.4)	21.7 (12.4-56.8)	10.2 (7.2-11.7)
	> 60(n=10)	9.0 (7.6-11.1)	10.2 (5.2-15.9)	8.9 (7.9-73.0)	66.9 (21.1-106.2)	24.4 (13.6-82.7)	7.4 (6.8-8.5)

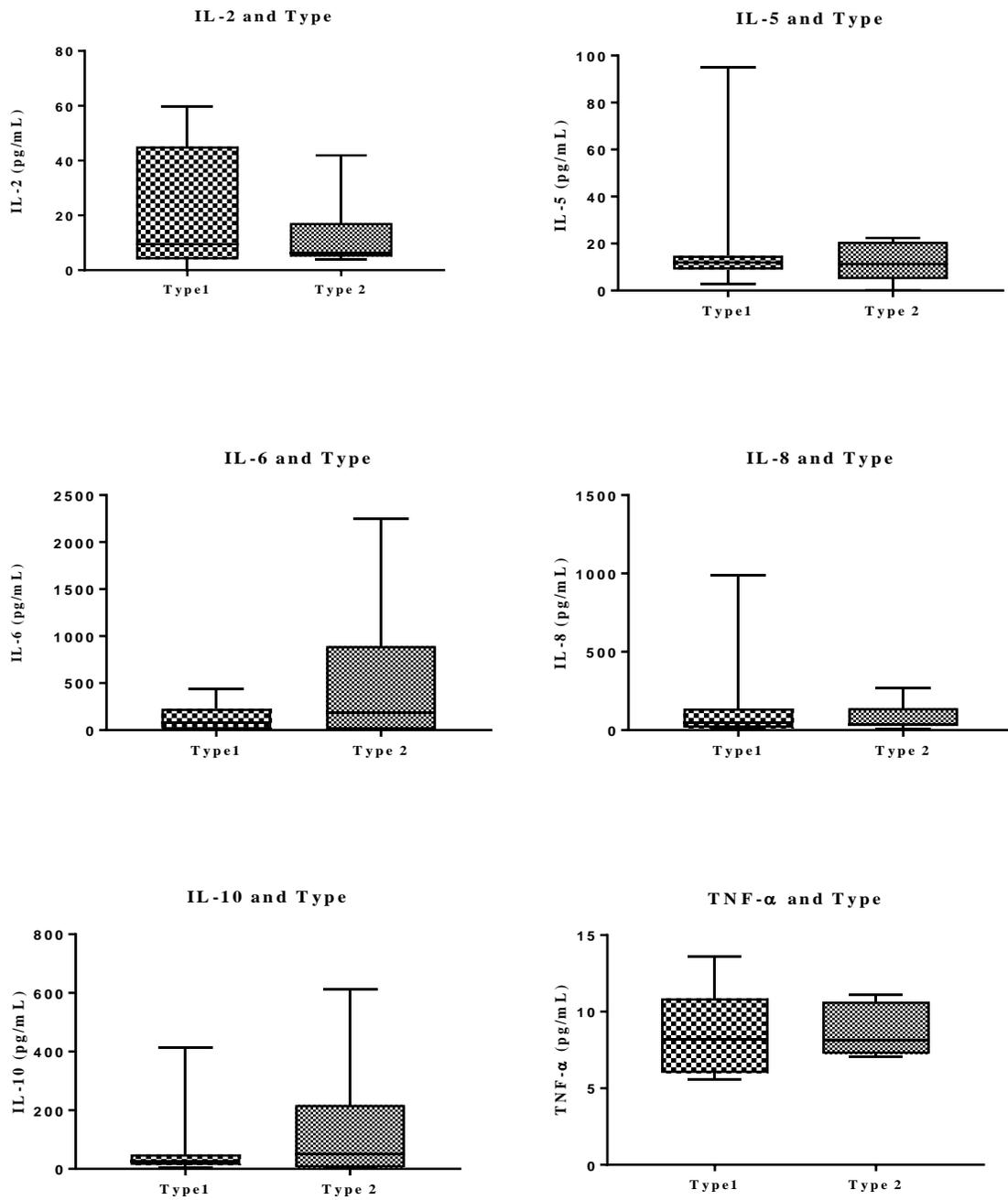
#####  $p=0,0203$  comparando com estágio I-III; #####  $p=0.0268$  comparado com SLD > 24 meses; SLD = sobrevida livre de doença SG = sobrevida global



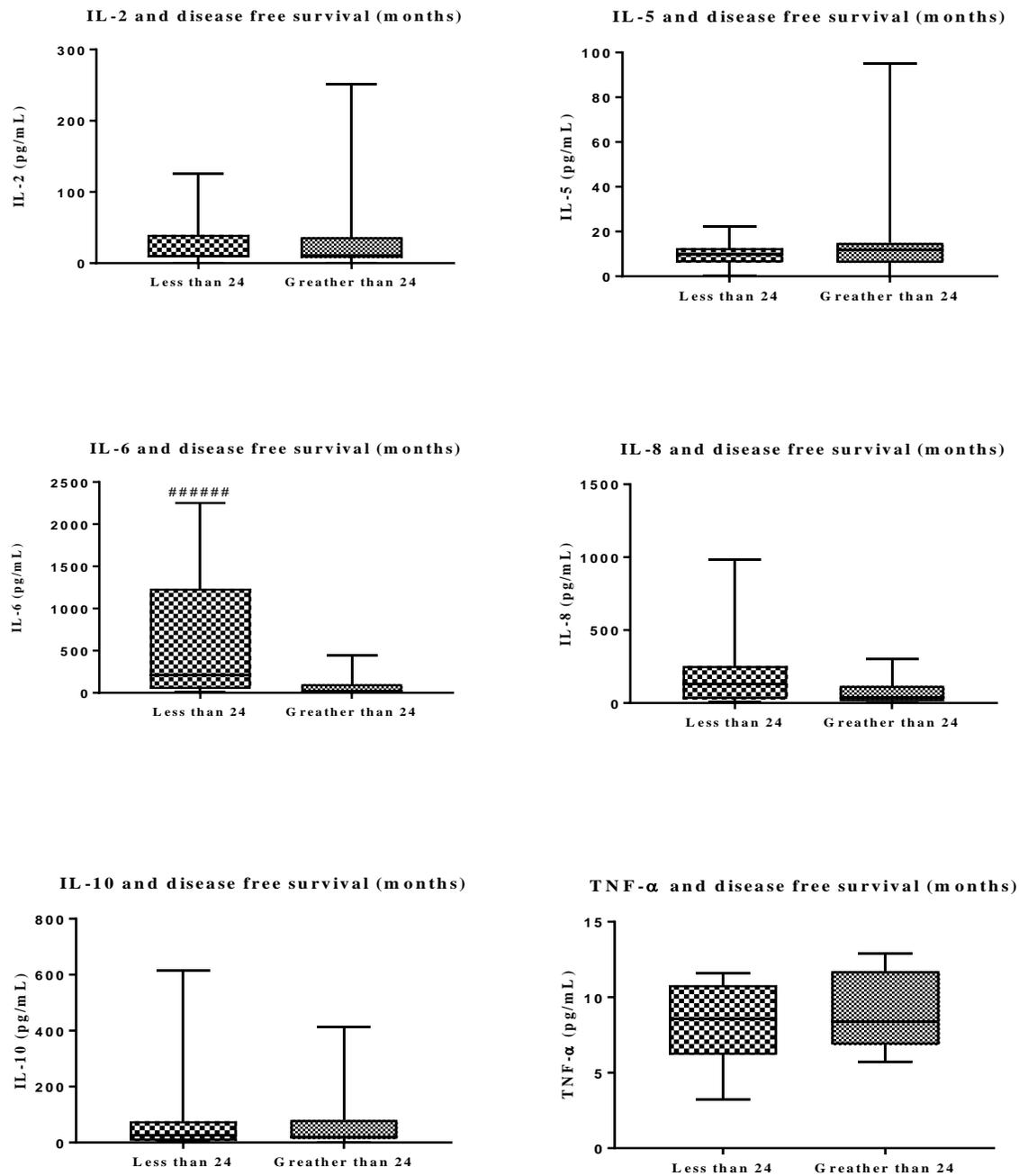
**Figura 11:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n=29) comparando pacientes com estágio I/II com paciente estágio III/IV.



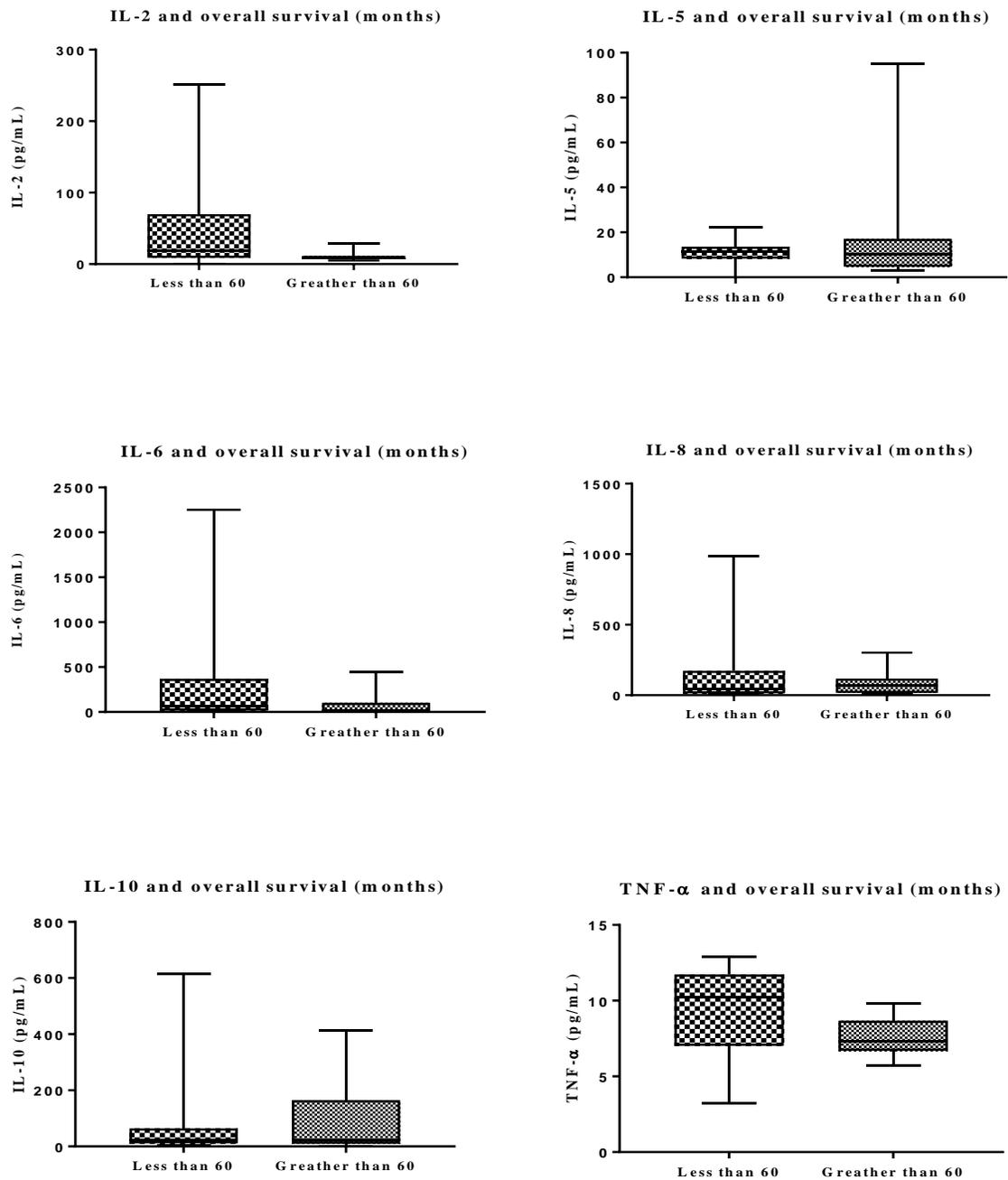
**Figura 12:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com grau 1/2 com paciente grau 3.



**Figura 13:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com tipo 1 com paciente tipo 2.



**Figura 14:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com a sobrevida livre de doença <24 meses com paciente com a sobrevida livre de doença >24 meses. (IL-6 p=0.0267).



**Figura 11:** Relação dos níveis de citocinas (mediana, percentis 25 e 75) em amostras do lavado peritoneal obtidos de pacientes com neoplasias malignas (n =29) comparando pacientes com a sobrevida global <60 meses com paciente com a sobrevida global >60 meses.

# **7. DISCUSSÃO**

## 7 DISCUSSÃO

A disseminação peritoneal de tumores ovarianos é um fator importante nas lesões neoplásicas de ovário, e sua presença pode alterar o prognóstico, e mesmo uma disseminação subclínica pode modificar o estadiamento. O uso de análises citológicas na lavagem peritoneal e ascite do câncer de ovário é um parâmetro prognóstico muito importante que auxilia como um preditor útil do envolvimento da superfície ovárica e metástase peritoneal, mesmo na ausência de disseminação clínica omental (NAZ et al., 2015). Por este motivo, a obtenção do lavado peritoneal e ascite faz parte da cirurgia de neoplasia ovariana, sendo rotineiramente realizada em cirurgias com suspeita de câncer de ovário. No entanto, a dosagem de citocinas na ascite ou lavado peritoneal não é utilizada na rotina de cirurgias de câncer de ovário, e na literatura há correlações de citocinas com estádios mais avançados de câncer de ovário. Então, estes achados poderiam complementar ainda mais o prognóstico e a compreensão acerca dos cânceres de ovário.

Devido à potente atividade de IL-2 como fator de crescimento de células T *in vitro*, essa citocina tem sido extensivamente estudada. Esta atividade oferece um meio para impulsionar diretamente a imunidade, ou um alvo para antagonizar respostas indesejadas, rejeição de transplantes e doenças autoimunes (DELEEUEW et al., 2015; MALEK; CASTRO, 2010). Em um estudo com camundongos com câncer de ovário, a utilização de IL-2 como monoterapia ou como adjuvante em terapia adotiva através de administração intraperitoneal de IL-2 produziu uma taxa de 25% de resposta objetiva em ensaios clínicos iniciais (DELEEUEW et al., 2015; ROSENBERG, 2014). Já em nosso estudo, os níveis de IL-2 não se relacionaram com nenhum fator prognóstico estudado, assim como no estudo feito por Martins-Filho et al., (2017) no líquido intracístico de

lesões malignas de ovário, e Sanguinete et al. (2017), que dosaram citocinas no soro de pacientes com câncer de ovário.

Estudos demonstraram que a expressão de IL-5, em algumas pacientes, é a interleucina com menor nível dosado em ascite (YIGIT et al., 2011), além de valores diminuídos de IL-2, IL-7, IL-17, em ascites quando comparado ao soro (GIUNTOLI et al., 2009). Altos níveis de IL-5 têm sido associados a alto grau histológico e doença mais avançada (TSAI-TURTON et al., 2009), o que sugere seu papel como fator prognóstico. No entanto, no estudo de Martins-Filho et al. (2017), que avaliou a IL-5 no líquido intracístico, não houve diferença entre os grupos estudados. O estudo de Sanguinete et al. (2017), realizado com análises do soro, não mostrou nenhuma relação de IL-5 com nenhum fator prognóstico estudado, assim como em nosso estudo, em lavado peritoneal, não ocorreu associação com fatores prognósticos.

Em um estudo recente, os níveis elevados de TNF- $\alpha$  na ascite em cirurgias primárias foram associados com uma diminuição da sobrevida livre de progressão após a cirurgia primária, bem como níveis concomitantemente aumentados de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram relacionados à progressão rápida da doença, sugerindo uma interação entre essas citocinas na progressão do câncer epitelial do ovário avançado. Além disso, níveis elevados de ascite em combinação com IL-8, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram associados com menor sobrevida livre de progressão (KOLOMEYEVSKAYA et al., 2015). Em o nosso estudo, observamos também uma interação entre IL-6 e IL-8 em alguns fatores prognósticos como NLR, PLR e CA-125.

Os fatores derivados de tumores são capazes de ativar macrófagos, o que leva à produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , favorecendo o microambiente tumoral, juntamente com a capacidade do tumor a gerar metástases. Por outro lado, citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6, podem ativar vias com potencial

antitumoral, agindo de duas formas diferentes. Assim, não é surpresa que exista conflito entre o papel deletério e potencial protetor. Membros da família IL-6 são mencionados como altamente expressos em vários tipos de câncer e são considerados como elos-chaves entre a inflamação, tumorigênese e metástase (KIM et al., 2010; TANIGUCHI & KARIN, 2014).

A IL-6 também pode aumentar a eficácia da imunidade antitumoral agindo na ativação e proliferação e sobrevivência dos linfócitos, como também aumenta o seu fluxo dos gânglios linfáticos (FISHER et al., 2011). Yigit et al. (2011) observaram uma relação entre a concentração de IL-6 na ascite e a doença residual após cirurgia de citorredução, porém os níveis de IL-6 foram maiores em comparação com a doença primária. Também, a IL-6 derivada de tumores pode provocar a trombocitose paraneoplásica em pacientes com câncer epitelial de ovário avançado, o que pode ser associado a um mal prognóstico (STONE et al., 2012).

TNF- $\alpha$ , agindo em TNFR2, tem ação completamente diferente ao TNFR1, pois o TNFR2 não está ligado a um domínio que leva a morte celular. Seu efeito promove a ativação de NF- $\kappa$ B e o crescimento celular. Piura *et al.* (2014) encontraram maior expressão de RNAm de TNFR2 em células neoplásicas ovarianas do que em células normais de ovário, mostrando que o TNF- $\alpha$  influencia na formação do carcinoma de ovário através de TNFR2. Estudos recentes também mostraram que o TNF- $\alpha$  ligado a TNFR1 faz com que o NF- $\kappa$ B seja levado ao núcleo, onde ativa genes envolvidos no crescimento celular, diferenciação e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-8, sendo observado principalmente em células de câncer de ovário que sobre-expressam CD9 (HWANG et al., 2012).

Em nosso estudo, níveis mais altos de IL-6 estiveram relacionados com fatores prognósticos como: RNL >4, RPL >200, CA-125 >35 U/mL, hemoglobina  $\geq$ 12 g/dL, estadiamentos IIIC e SLD

≤24 meses, como também foi a única interleucina em que os níveis aumentados estiveram relacionados a lesões malignas quando comparado com lesões não neoplásicas na comparação entre grupos, indo de encontro com a literatura, ou seja, a IL-6 condiz com um pior prognóstico independente para o câncer de ovário. Em nosso estudo, também observou-se uma interação entre as IL-6 e IL-8 em alguns fatores prognósticos como NLR, PLR e CA-125, com tendência a se associar também em comparações de hemoglobina em níveis normais. Assim como mencionado por Hwang *et al.*, (2012), a produção de interleucinas como IL-6 e IL-8 podem ser ativadas pela ligação de TNF- $\alpha$  ao TNFR1. A relação destas citocinas com a evolução do câncer de ovário é evidente em nosso trabalho, mas o níveis de TNF- $\alpha$  não se relacionou com nenhum fator prognóstico, o que poderia ser explicado pelo balanço entre a quantidade de TNFR1 e TNFR2. A ligação de TNF- $\alpha$  a TNFR1 pode ter um papel antitumoral, mas sua ligação a TNFR2 pode desempenhar um papel pró-tumoral. Estudos como de Martins-Filho *et al.*, (2017) e Sanguinete *et al.*, (2017) encontraram resultados semelhantes e relacionaram níveis altos de IL-6 e IL-8 a um pior prognóstico no câncer de ovário.

Além disso, em todas as vezes que os níveis altos de IL-8 estava correlacionado com algum fator prognóstico, a IL-6 também apresentava significância estatística, mostrando uma interação entre estas duas citocinas e ambas correlacionadas a um mal prognóstico, como citado por Kolomeyevskaya *et al.*, (2015), Yigit *et al.*, (2011) e HWANG *et al.*, (2012) em células que sobre expressavam CD9. Além disso YIGIT *et al.*, (2011) encontraram níveis elevados de IL-6 e IL-8 em várias amostras e relacionaram a hipóxia e necrose que são comuns em câncer epitelial de ovário e podem ser um gatilho para a produção destas interleucinas. Neste trabalho, os autores não encontraram nenhuma correlação de IL-8 com CA125 após a quimioterapia de 3 a 6 meses. No

entanto, em nosso estudo, esta relação está presente, mas os casos estudados aqui foram de cirurgias primárias e não foi avaliado paciente após a cirurgia de citorredução.

Embora o papel de IL-10 no câncer seja amplamente estudado, a relação exata com os tumores ainda necessita de ser elucidada. Em nossa avaliação da IL-10 no lavado peritoneal, níveis elevados dessa citocina estiveram relacionados com níveis normais de CA15-3, mas não mostrou diferença entre os grupos de lesões não neoplásicas, benignas e malignas.

A principal limitação do estudo é a pequena amostra de pacientes. Novos estudos com maior número de casos são indispensáveis para estabelecer um perfil de citocinas que melhor prevejam o prognóstico da doença.

## 8 CONCLUSÃO

A IL-6 foi relacionada aos lavados peritoneais de lesões malignas de ovário, quando comparado os grupos de lesões não neoplásicas, benignas e malignas mostrando que altos níveis desta citocinas se relaciona diretamente com casos mais graves de lesões ovarianas.

IL-6 e IL-8 no lavado peritoneal estiveram relacionadas com fatores de mau prognóstico e estão relacionados a casos mais avançados e ao desenvolvimento do câncer de ovário. A avaliação do perfil dessas citocinas no lavado peritoneal em uma amostra maior de pacientes pode ser importante na melhor definição do prognóstico de cada paciente, individualizando o tratamento adjuvante tornando mais ou menos agressivo dependendo do perfil. Além disso, a avaliação do perfil dessas citocinas no lavado peritoneal poderá ser alvo do estudo de novas terapias no câncer de ovário.

## **8. REFERÊNCIAS**

## 9 REFERÊNCIAS

ADAMS, S. F. et al. A high response rate to liposomal doxorubicin is seen among women with BRCA mutations treated for recurrent epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol.**, v. 123, n. 5, p. 213–223, 2011.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Survival Rates for Ovarian Cancer by Stage**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/detailedguide/ovarian-cancer-survival-rates>>. Acesso em: 4 nov. 2017.

AUDEH, M. W. et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: A proof-of-concept trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9737, p. 245–251, 2010.

BARNETT, J. C. et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (Treg) cells are associated with a metastatic phenotype. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 3, p. 556–562, 2010.

BAST, R. C.; HENNESSY, B.; MILLS, G. B. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 415–428, 2009.

BOYD, J. et al. Clinicopathologic Features of BRCA-Linked and Sporadic Ovarian Cancer. **Jama**, v. 283, n. 17, p. 2260, 2000.

BU, M. et al. Ovarian carcinoma-infiltrating regulatory T cells were more potent suppressors of CD8+ T cell inflammation than their peripheral counterparts, a function dependent on TIM3 expression. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3949–3956, 2015.

CANNISTRA, S. A. Cancer of the Ovary. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 24, p. 2519–2529, 2004.

CHARLES, K. A. et al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. **J Clin Invest**, v. 119, n. 10, p. 3011–23, 2009.

CHO, H. et al. CA19-9 elevation in ovarian mature cystic teratoma: discrimination from ovarian cancer - CA19-9 level in teratoma. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 19, p. 230–5, 2013.

CHO, H.; KYUNG, M. S. Serum CA19-9 as a Predictor of Malignancy in Primary Ovarian Mucinous Tumors: A Matched Case-Control Study. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1334–1339, 2014.

CHUDECKA-GLĄZ, A. M. et al. Assessment of selected cytokines, proteins, and growth factors in the peritoneal fluid of patients with ovarian cancer and benign gynecological conditions. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 471–485, 2015.

CURIEL, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**, v. 10, n. 9, p. 942–949, 2004.

DAVID, Y. BEN et al. Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 2, p. 463–466, 2002.

DELEEuw, R. J. et al. CD25 Identifies a Subset of CD4+FoxP3- TIL That Are Exhausted Yet Prognostically Favorable in Human Ovarian Cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 3, p. 245–253, 2015.

DIRICAN, A. et al. Do the derived neutrophil to lymphocyte ratio and the neutrophil to lymphocyte ratio predict prognosis in breast cancer? **International Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 70–81, 2015.

DRAPKIN, R. et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. **Cancer Research**, v. 65, n. 6, p. 2162–2169, 2005.

DUFFY, S. A. et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 750–757, 2008.

EICHTEN, A. et al. Resistance to anti-VEGF therapy mediated by autocrine IL6/STAT3 signaling and overcome by IL6 blockade. **Cancer Research**, v. 76, n. 8, p. 2327–2339, 2016.

EVANS, D. G. et al. Screening for familial ovarian cancer: poor survival of BRCA1/2 related cancers. **Journal of medical genetics**, v. 46, p. 593–597, 2009.

FENG, Z. et al. Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 686–691, 2011.

FISHER, D. T. et al. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 3846–3859, 2011.

FONG, P. C. et al. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: Frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 15, p. 2512–2519, 2010.

GALGANO, M. T.; HAMPTON, G. M.; FRIERSON, H. F. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. **Modern Pathology**, n. April, p. 847–853, 2006.

GALLAGHER, D. J. et al. Survival in epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis incorporating BRCA mutation status and platinum sensitivity. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 5, p. 1127–1132, 2011.

GAO, G. et al. Chronic stress promoted the growth of ovarian carcinoma via: Increasing serum levels of norepinephrine and interleukin-10 and altering nm23 and NDRG1 expression in tumor tissues in nude mice. **BioScience Trends**, v. 7, n. 1, p. 56–63, 2013.

GIROLIMETTI, G. et al. BRCA-associated ovarian cancer: From molecular genetics to risk management. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GIUNTOLI, R. L. et al. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: Implications for antitumor immunity. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2875–2884, 2009.

GOVINDARAJ, C. et al. Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2+ Tregs within the tumor microenvironment. **Clinical Immunology**, v. 149, n. 1, p. 97–110, 2013.

GUPTA, M. et al. TNF- $\alpha$  expression, risk factors, and inflammatory exposures in ovarian cancer: Evidence for an inflammatory pathway of ovarian carcinogenesis? **Human Pathology**, v. 54, p. 82–91, 2016.

HAGEMANN, T. et al. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF- $\kappa$ B. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 6, p. 1261–1268, 2008.

HAMED, E. O. et al. Significance of HE4 estimation in comparison with CA125 in diagnosis of ovarian cancer and assessment of treatment response. **Diagnostic pathology**, v. 8, p. 11, 2013.

HANASH, S. M.; PITTERI, S. J.; FACA, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 571–579, 2008.

HUANG, F. et al. Targeting BRCA1- and BRCA2-deficient cells with RAD52 small molecule inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, p. 4189–4199, 2016.

HWANG, J. R. et al. Upregulation of CD9 in ovarian cancer is related to the induction of TNF- $\alpha$  gene expression and constitutive NF- $\kappa$ B activation. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 77–83, 2012.

INCA, I. N. DE C. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

JAMMAL, M. et al. Immunohistochemical staining of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 in benign and malignant ovarian neoplasms. **Oncology Letters**, v. 9, n. 2, p. 979–983, 2014.

JENSEN, R. B.; CARREIRA, A.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 678–683, 2010.

JUNG, S. IL. Ultrasonography of ovarian masses using a pattern recognition approach. **Ultrasonography**, v. 34, n. 3, p. 173–182, 2015.

KIM, S. et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 102–106, 2009.

KIM, S. et al. Carcinoma Produced Factors Activate Myeloid Cells via TLR2 to Stimulate Metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 102–106, 2010.

KOENSGEN, D. et al. Cytokine Polymorphism of the IL-8 gene and the risk of ovarian cancer. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 334–338, 2015.

KOH, C.-H. et al. Utility of pre-treatment neutrophil–lymphocyte ratio and platelet–lymphocyte ratio as prognostic factors in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 1, p. 150–158, 2015.

KOLOMEYEVSKAYA, N. et al. Cytokine profiling of ascites at primary surgery identifies an interaction of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in predicting reduced progression-free survival in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 138, n. 2, p. 352–357, 2015.

KULBE, H. et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p. 585–592, 2007.

KULBE, H. et al. A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. **Cancer Research**, v. 72, n. 1, p. 66–75, 2012.

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

KWA, M. et al. Ovarian Cancer in BRCA Mutation Carriers: Improved Outcome After Intraperitoneal (IP) Cisplatin. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n. 5, p. 1468–1473, 2014.

LANE, D. et al. Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 492, 2015.

LEDERMANN, J. A. PARP inhibitors in ovarian cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, n. November, p. i40–i44, 2016.

LIANG, B. et al. Circulating VEGF as a biomarker for diagnosis of ovarian cancer: A systematic review and a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 1075–1082, 2015.

LIAO, W. C. et al. Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 428–434, 2008.

LIU, C. Z. et al. Overexpression and immunosuppressive functions of transforming growth factor 1, vascular endothelial growth factor and interleukin-10 in epithelial ovarian cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 24, n. 2, p. 130–137, 2012.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287–294, 2012.

LU, D. et al. Comparison of candidate serologic markers for type I and type II ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 122, n. 3, p. 560–566, 2011.

MAGWOOD, A. C.; MUNDIA, M. M.; BAKER, M. D. High levels of wild-type BRCA2 suppress homologous recombination. **Journal of Molecular Biology**, v. 421, n. 1, p. 38–53, 2012.

MALEK, T. R.; CASTRO, I. **Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity** Elsevier Inc., , 2010.

MARTINS-FILHO, A. et al. Role of Intracystic Cytokines and Nitric Oxide in Ovarian Neoplasms. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2017.

MASOUMI-MOGHADDAM, S. et al. Intratumoral interleukin-6 predicts ascites formation in patients with epithelial ovarian cancer: A potential tool for close monitoring. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, p. 58, 2015.

MATTE, I. et al. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. **American journal of cancer research**, v. 2, n. 5, p. 566–80, 2012.

MAVADDAT, N. et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 21, n. 1, p. 134–147, 2012.

MEINHOLD-HEERLEIN, I.; HAUPTMANN, S. The heterogeneity of ovarian cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 289, n. 2, p. 237–239, 2014.

MICHALAKI, V. et al. Serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. **British Journal of Cancer**, p. 2312–2316, 2004.

MURTA, E. F. C.; NOMELINI, R. S. Early diagnosis and predictors of malignancy of adnexal masses. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 18, n. 1, p. 14–9, 2006.

NAYLOR, M. S. et al. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 5, p. 2194–206, 1993.

NAZ, S. et al. Role of peritoneal washing cytology in ovarian malignancies: correlation with histopathological parameters. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 1, p. 315, 2015.

NEGRIER, S. et al. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: Prognostic value of interleukin-6 - From the Groupe Français d'Immunothérapie. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 12, p. 2371–2378, 2004.

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

PANDIT, R. et al. Non-Small-Cell Lung Cancer Associated With Excessive Eosinophilia and Secretion of Interleukin-5 as a Paraneoplastic Syndrome. **American journal of hematology**, v. 82, n. 9, p. 807–811, 2007.

PAULL, T. T. et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. **Current Biology**, v. 10, n. 15, p. 886–895, 2000.

PIURA, B. et al. Distinct expression and localization of TNF system in ovarian carcinoma tissues: Possible involvement of TNF- $\alpha$  in morphological changes of ovarian cancerous cells. **Anticancer Research**, v. 34, n. 2, p. 745–752, 2014.

ROETT, M. A.; EVANS, P. Ovarian Cancer: An Overview. **American Academy of Family Physicians**, v. 80, n. 6, p. 609–616, 2009.

ROSEN, D. G. et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 2, p. 267–277, 2005.

ROSENBERG, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 2014.

ROSENTHAL, A. N. et al. Evidence of Stage Shift in Women Diagnosed With Ovarian Cancer During Phase II of the United Kingdom Familial Ovarian Cancer Screening Study. **Journal of Clinical Oncology**, p. JCO.2016.69.9330, 27 fev. 2017.

RUGGERI, G. et al. HE4 and epithelial ovarian cancer: Comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 15–16, p. 1447–1453, 2011.

SAFRA, T. et al. BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 10, p. 2000–2007, 2011.

SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 490–500, 2010.

SANGUINETE, M. M. M. et al. Serum IL-6 and IL-8 Correlate with Prognostic Factors in Ovarian Cancer. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 7, p. 677–688, 2017.

SELVENDIRAN, K. et al. Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 9, p. 2198–2204, 2009.

SHIH, I.-M.; KURMAN, R. J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1511–8, 2004.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIEGMUND, D. et al. Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. **Cell Death and Disease**, p. 1–10, 2016.

SINGHA, B. et al. IKK inhibition increases bortezomib effectiveness in ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 26347–58, 2015.

STAPLES, J.; GOODMAN, A. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. **Ovarian Cancer-A Clinical and Translational Update. InTech**, 2013.

STATHOPOULOS, G. T. et al. Host-derived interleukin-5 promotes adenocarcinoma-induced malignant pleural effusion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 10, p. 1273–1281, 2010.

STONE, R. L. et al. Paraneoplastic Thrombocytosis in Ovarian Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 7, p. 610–618, 2012.

SUGIYAMA, T.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 31663–31672, 2002.

TAN, D. S. P. et al. “BRCAness” syndrome in ovarian cancer: A case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 34, p. 5530–5536, 2008.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 54–74, 2014.

TEW, W. P. et al. Intravenous aflibercept in patients with platinum-resistant, advanced ovarian cancer: Results of a randomized, double-blind, phase 2, parallel-arm study. **Cancer**, v. 120, n. 3, p. 335–343, 2014.

TIMMERMAN, D. et al. Subjective assessment of adnexal masses with the use of ultrasonography: An analysis of interobserver variability and experience. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 1, p. 11–16, 1999.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TRABERT, B. et al. Pre-diagnostic serum levels of inflammation markers and risk of ovarian cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. **Gynecologic Oncology**, v. 135, n. 2, p. 297–304, 2014.

TSAI-TURTON, M. et al. P53 Autoantibodies, Cytokine Levels and Ovarian Carcinogenesis. **Gynecologic Oncology**, v. 114, n. 1, p. 12–17, 2009.

TUTT, A. et al. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. **EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4704–4716, 2001.

VALENTIN, L. Pattern recognition of pelvic masses by gray-scale ultrasound imaging: The contribution of Doppler ultrasound. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 14, n. 5, p. 338–347, 1999.

VAN CALSTER, B. et al. Polytomous diagnosis of ovarian tumors as benign, borderline, primary invasive or metastatic: Development and validation of standard and kernel-based risk prediction models. **BMC Medical Research Methodology**, v. 10, 2010.

VAN CALSTER, B. et al. Evaluating the risk of ovarian cancer before surgery using the ADNEX model to differentiate between benign, borderline, early and advanced stage invasive, and

secondary metastatic tumours: prospective multicentre diagnostic study. **Bmj**, v. 349, n. oct07 3, p. g5920–g5920, 2014.

VERGOTE, I. et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. **Lancet**, v. 357, n. 9251, p. 176–182, 2001.

WANG, Y. et al. Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. **Cytokine**, v. 59, n. 1, p. 145–155, 2012.

WILLIAMS, K. A. et al. Polymorphisms of MUC16 (CA125) and MUC1 (CA15.3) in relation to ovarian cancer risk and survival. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

WU, S. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor  $\alpha$  expression. **Cancer Res.**, v. 53, p. 1939–1944, 1993.

YAMANE, K.; KATAYAMA, E.; TSURUO, T. The BRCT regions of tumor suppressor BRCA1 and of XRCC1 show DNA end binding activity with a multimerizing feature. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 279, p. 678–684, 2000.

YAN, B. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. **Cancer Research**, v. 66, n. 24, p. 11565–11570, 2006.

YIGIT, R. et al. Cytokine analysis as a tool to understand tumour-host interaction in ovarian cancer. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 12, p. 1883–1889, 2011.

YIN, Y. Z.; WANG, Y. C. Analysis of behaviour of steel beams with web openings at elevated temperatures. **Steel and Composite Structures**, v. 6, n. 1, p. 15–31, 2006.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science**, v. 95, n. 11, p. 866–871, 2004.

ZAYNAGETDINOV, R. et al. Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. **Cancer Research**, v. 75, n. 8, p. 1624–1634, 2015.