

EDUARDO BATISTA CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA IMUNE Th1, Th2 E Th17,
EM MULHERES COM CÂNCER EPITELIAL DOS OVÁRIOS

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
2011

EDUARDO BATISTA CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA IMUNE Th1, Th2 e Th17,
EM MULHERES COM CÂNCER EPITELIAL DOS OVÁRIOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – Programa Saúde da Mulher, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do Título de Doutor em Ginecologia.

Orientador: Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
2011



Cândido, Eduardo Batista.
C217a Avaliação do perfil da resposta imune Th1, Th2 e Th17, em mulheres com carcinoma epitelial dos ovários [manuscrito]./ Eduardo Batista Cândido.
— Belo Horizonte: 2011.
96f.: il.

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Ovarianas. 2. Citometria de Fluxo. 3. Imunidade adaptativa.
4. Citocinas. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Silva Filho, Agnaldo Lopes.
II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WP 322

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

Reitor

PROF. CLÉLIO CAMPOLINA DINIZ

Vice-Reitora

PROF^A ROCKSANE DE CARVALHO NORTON

Pró-Reitor de Pós-Graduação

PROF. RICARDO SANTIAGO GOMEZ

Pró-Reitor de Pesquisa

PROF. RENATO DE LIMA DOS SANTOS

Diretor da Faculdade de Medicina

PROF. FRANCISCO JOSÉ PENNA

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

PROF. TARCIZO AFONSO NUNES

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

PROF. MANOEL OTÁVIO DA COSTA ROCHA

Sub-Coordenadora do Centro de Pós-Graduação

PROF^A TERESA CRISTINA DE ABREU FERRARI

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

PROF. CÉZAR ALENCAR DE LIMA REZENDE

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

PROF. ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

PROF. ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL

PROF. SELMO GEBER

PROF. VICTOR HUGO DE MELO

PROFA. ALAMANDA KFOURY PEREIRA

GABRIEL COSTA OZANAN (DISC. TITULAR)

Ao Senhor Deus, por tudo.

Aos meus pais, Orlando e Nacira, pela dedicação,
amor e incentivo ao longo de minha vida.

À minha querida Jú, pelo amor, carinho e
compreensão nos longos períodos de ausência.

À minha irmã Andréa e meu sobrinho Rubens,
pela amizade e carinho sempre presentes.

Aos familiares, Antônio Dibai, Mabel, Judson, Caroline,
André, Cristiane, Davi e Isabelle pelos bons momentos.

Ao querido “Rafa” que está para chegar.

Ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, pelos ensinamentos
que ampliaram meus horizontes na pesquisa científica e
por me fazer concretizar algo antes inatingível

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, que me transmitiu os fundamentos da Cirurgia Pélvica e me possibilitou entender que o homem se faz pelo seu conhecimento.

Às Professoras Luciana Maria Silva, do departamento de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias (Funed), e Andréa Teixeira de Carvalho, do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz), pelo apoio logístico na captação, preparação e processamento do material colhido durante as operações. Também pela cortesia, disponibilidade e receptividade.

À biomédica Bianca Della Croce Vieira Cota, por todo apoio logístico na coleta, preparo e processamento das amostras de tumor, líquido intracístico, ascite e soro das pacientes envolvidas no estudo. Também não seria possível a concretização desse projeto sem sua ajuda. Agradeço ainda a todos os colegas da Funed e da Fiocruz, que de alguma forma ajudaram-me a concretizar este projeto.

Aos colegas, Renilton Aires Lima, Geam Karlo de Assis Santana e Lucas Barbosa da Silva, pelo apoio, amizade e ajuda no processo de coleta dos casos e controles.

Aos alunos de graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, Roberto Mundim Porto Filho e Rafael Borges Salera, pela imensurável ajuda na coleta de dados clínicos e grande ajuda no acompanhamento e seguimento das pacientes. Tal colaboração foi essencial para realização desta tese.

Este estudo recebeu apoio do CNPq.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1º Coríntios 13:2

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste.”

Steven Paul Jobs

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
CBA	Do Inglês: <i>Cytometric Bead Array</i>
CEO	Câncer Epitelial de Ovário
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
CMF	Citometria de Fluxo
CYCHR	Do Inglês: <i>Cychrome</i>
DC	Células Dendríticas
EDTA-K3	Ácido Etileno-diamino Tetracético
FACS	Do Inglês: <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FITC	Isoticianato de Fluoresceína
FSC	Do Inglês: <i>Forward Scatter</i>
IL	CITOCINA
IFN- γ	Interferon Gama
MAK	Do Inglês: <i>Macrophage-activated Killer Cells</i>
μ L	Microlitro
MHC	Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Fator Inibidor de Macrófagos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NK	Do Inglês: <i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro
PE	Ficoeritrina
TAA	Antígenos Associados ao Tumor
TIL	Infiltrado Linfocitário Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAF2	Receptor do TNF Associado ao Fator 2
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 (A-D): Laparotomia para citorredução primária do câncer de ovário	21
FIGURA 3.1: Representação esquemática da técnica de CBA.....	38
FIGURA 3.2: Fluxograma do protocolo básico do processo de dosagem das quimiocinas.....	39
FIGURA 3.3: Modelo de aquisição dos dados no citômetro de fluxo pelo kit CBA/BD e leitura dos resultados em pg/mL	41
FIGURA 3.4: Gráfico do tipo “pseudocolor” das concentrações das citocinas obtidas por citometria de fluxo na plataforma de beads no sistema CBA.....	42
FIGURA 4.1: Perfil de distribuição das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α nos diferentes no tumor, líquido intracístico, líquido ascítico e soro de pacientes com câncer epitelial de ovário	46
FIGURA 4.2-A: Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-6 no tumor.....	52

FIGURA 4.2-B:	
Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-6 no líquido ascítico.....	53
FIGURA 4.3-A:	
Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-10 no tumor.....	54
FIGURA 4.3-B:	
Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-10 no líquido ascítico.....	55
FIGURA 4.4	
Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IFN- γ no líquido intracístico.....	56
FIGURA 4.5:	
Representação esquemática da razão entre citocinas mostrando o perfil de resposta imune em pacientes com CEO, nos quatro diferentes sítios tumorais	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1:

Características gerais da amostra 45

TABELA 4.2:

Comparação das concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no tumor e soro entre pacientes com CEO e grupo controle 47

TABELA 4.3:

Comparação entre as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , e os fatores prognósticos estadiamento, citorredução na cirurgia primária e grau de diferenciação tumoral nos diferentes 49

TABELA 4.4:

Comparação entre as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e os níveis séricos do marcador tumoral CA-125 nos diferentes sítios (tumor, líquido intracístico, ascite e soro) 50

Tabela 4.5:

Associação entre recorrência e sobrevida global e as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ na ascite, líquido intracístico, tumor e soro das pacientes com câncer epitelial de ovário 51

SUMÁRIO

RESUMO	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer epitelial de ovário	20
1.2 Resposta imune	22
1.3 Sistema imune e câncer	23
1.4 Câncer de ovário e citocinas	25
1.5 Justificativa do estudo	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1 Casuística	34
3.1.1 Critérios de inclusão	35
3.1.2 Técnica cirúrgica	35
3.2 Método	36
3.2.1 Avaliação histológica	36
3.2.2 Obtenção das amostras para dosagem de citocinas	36
3.2.3 Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , INF- γ	37
3.4 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	43
4.1 Características gerais da amostra	44
4.2 Avaliação das concentrações das citocinas	45
4.3 Avaliação dos perfis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no tumor, líquido intracístico, ascite e soro das pacientes com CEO	46
4.4 CEO <i>versus</i> grupo controle	47
4.5 Citocinas <i>versus</i> fatores prognósticos em paciente com CEO	47

4.6 Comparação entre as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e os níveis séricos do marcador CA-125, nos diferentes sítios (tumor, líquido intracístico, ascite e soro) nas pacientes com CEO	48
4.7 Avaliação entre as concentrações das citocinas nos diferentes sítios e recorrência e sobrevida das pacientes com CEO	50
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO	69
7 REFERÊNCIAS.....	71
8 ANEXOS.....	84
I Estadiamento do câncer de ovário (FIGO, 1994)	85
II Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP)	86
III Consentimento livre e esclarecido	87
IV Protocolo do Kit CBA/BD.....	89
9 SUMMARY	95
ATA DA DEFESA DE TESE	97
DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA TESE.....	98

RESUMO

Introdução:

O câncer epitelial de ovário (CEO) representa um desafio à Oncologia Ginecológica devido ao seu caráter insidioso e alta letalidade. O sistema imunológico interage com o tumor em desenvolvimento podendo determinar sua progressão/regressão. Este estudo visa avaliar a resposta imune Th1, Th2 e Th17 em mulheres com CEO.

Métodos:

Avaliaram-se prospectivamente 44 mulheres com CEO e 32 mulheres sem evidência de neoplasia maligna (grupo controle). Foram coletadas amostras de tumor/ovário normal, líquido intracístico, ascite e soro. A avaliação da resposta imune foi realizada por meio da dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ utilizando CBA (*Cytometric Bead Array*). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste Mann-Whitney ou Kruskal-Walis e recorrência e sobrevida por Cox Regression. As diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados:

Não houve diferença entre os grupos em relação à idade e paridade. No grupo de mulheres com CEO, 12 (27,2%) apresentavam estágios I/II e 32 (72,7%) estágios III/IV. As pacientes com CEO apresentaram maiores concentrações de TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 (tumor) e IL-10 e TNF- α (soro) em comparação ao grupo controle. A ascite e líquido intracístico representaram os sítios com maiores concentrações de citocinas nas pacientes com CEO comparados ao soro e tumor. Houve uma associação de maiores níveis séricos do CA-125 com maior concentração de IL-10 (líquido intracístico) e TNF- α (soro). Pacientes com neoplasias pouco diferenciadas apresentaram uma maior

concentração de IL-4 (líquido intracístico), IL-6 (líquido intracístico e tumor) e IL-10 (ascite e líquido intracístico). Mulheres com estágios III/IV apresentaram uma maior concentração de IL-10 (tumor e ascite) e TNF- α (soro e ascite). Mulheres submetidas à cirurgia de citorredução insatisfatória apresentaram maiores concentrações de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α e menores concentrações de IFN- γ em comparação àquelas submetidas à citorredução ótima. Mulheres com maiores concentrações de IL-6 e IL-10 (tumor e ascite) e menores concentrações de IFN- γ (líquido intracístico) apresentaram menor sobrevida global.

Conclusões:

Mulheres com CEO apresentam predominantemente uma resposta imune Th2 e um padrão de imunossupressão. Esse perfil parece exercer um papel importante na progressão tumoral, sendo evidenciada uma associação de IL-6, IL-10 e IFN- γ com o prognóstico de pacientes com CEO.

Palavras-chave: Câncer epitelial de ovário; Resposta imune adaptativa; Citometria de fluxo; Citocinas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO

O câncer epitelial do ovário (CEO) representa um desafio à Oncologia Ginecológica devido ao seu caráter insidioso e à sua alta letalidade (Silva-Filho, 2004). É a primeira causa de morte entre os tumores ginecológicos nos Estados Unidos e a quarta maior causa de morte entre as mulheres (Jemal, Siegel, et al.). Para o ano de 2011, são estimados 21.990 novos casos e 15.460 mortes em mulheres americanas (ACS 2011; 2011). No Brasil configura-se como o sexto tumor ginecológico mais comum, porém o de maior letalidade. Estimativas mais recentes datam do ano de 2009, com a ocorrência de 3.837 novos casos e 2.836 mortes (INCA, 2009).

Citam-se como fatores de risco importantes para o desenvolvimento do câncer de ovário, não relacionado a alterações genéticas, a idade, a menarca precoce, a menopausa tardia, a obesidade e a síndrome dos ovários policísticos. Inibidores da ovulação, como as anticoncepcionais têm um efeito protetor. (Partridge, Kreimer et al. 2009) As manifestações clínicas do câncer de ovário são em sua maioria inespecíficas e variam desde desconforto abdominal com mudanças do hábito intestinal, com anorexia e perda ponderal até o encontro de grande massa no abdome e distensão por ascite nos estágios avançados (Burges and Schmalfeldt).

Aproximadamente 2/3 dos casos são diagnosticados nos estágios III e IV, com

uma sobrevida em cinco anos variando de 10 a 20%, principalmente pela ausência de métodos de rastreamento e diagnóstico inadequados, tendo os exames de imagem como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética, associadas aos marcadores séricos como o CA-125, baixos valores de predição (Brewer, Johnson et al., 2003; Burges and Schmalfeldt, 2011). Embora o CEO possa ocorrer em qualquer idade, é mais comum em mulheres com mais de 50 anos. O tratamento convencional inclui citorredução cirúrgica seguida de quimioterapia, quando indicada (Roett and Evans, 2009).

Apesar dos avanços no tratamento, a mortalidade por CEO não se modificou nas últimas duas décadas (Ries, Wingo et al., 2000) (Fig. 1.1: A a D).

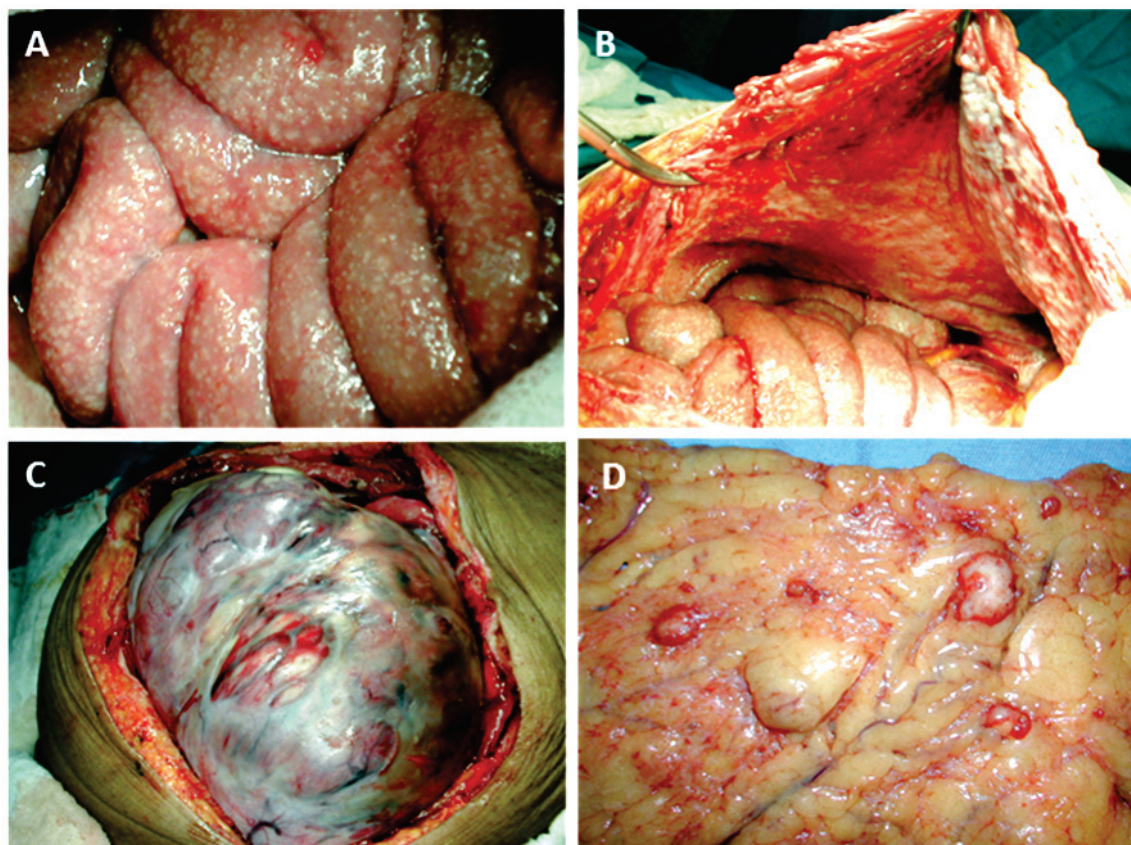


Figura 1.1 (A-D): Laparotomia para citorredução primária do câncer de ovário.

Nota: Fotografias evidenciando tumores epiteliais de ovário em estágios avançados na laparotomia para citorredução primária. A = Carcinomatose envolvendo alças de intestino delgado; B = Carcinomatose em alças intestinais e parede abdominal; C = Tumor primário de ovário; D = Grande omento acometido por metástases do câncer epitelial de ovário.

1.2 RESPOSTA IMUNE

A resposta imune pode ser dividida em inata ou adaptativa. A imunidade inata está associada às fases iniciais da resposta imune e atua contra o agente agressor de maneira inespecífica, não se alterando com a repetida exposição a esse agente (Medzhitov and Janeway, 2000).

A imunidade adaptativa acentua mecanismos efetores similares àqueles da resposta inata, direcionando-os com maior precisão. Essa resposta é determinada pela ativação de macrófagos ou pela produção de anticorpos (Moser and Murphy, 2000). A definição de qual será a via dominante está associada à diferenciação das células T CD4 virgens em células Th1 ou Th2 no tecido linfóide. As células Th1 estão associadas à ativação de macrófagos e as células Th2, à produção de anticorpos (Constant and Bottomly, 1997). Os mecanismos que controlam esta diferenciação ainda não estão bem definidos. Sabe-se que as citocinas, presentes nos tecidos no início da fase de diferenciação, têm grande influência nesse processo (Constant and Bottomly, 1997).

Macrófagos e linfócitos ativados atuam de forma interativa na liberação de citocinas que amplificam a resposta imune (Svanborg, Godaly et al., 1999). As células T dividem-se em duas classes principais com funções efetoras distintas, diferenciadas pela expressão de proteínas de superfície celular, CD4 e CD8. Essas subpopulações de células T diferem-se na classe de molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que eles reconhecem. Existem duas classes de molécula MHC: o MHC de classe I e o MHC de classe II, que apresentam estrutura e padrão de expressão diferentes nos tecidos do organismo. A proteína de superfície celular CD4 liga-se à molécula de classe II, e CD8, à molécula de classe I. Durante o reconhecimento do antígeno, as moléculas CD4 e CD8 associam-se

com o receptor de célula T e se ligam a sítios invariáveis na porção MHC do complexo MHC-peptídeo. Essa ligação, também dependente de outras moléculas denominadas co-estimuladoras, como as proteínas CD40, CD28 e CD86, é necessária para que a célula T realize uma resposta eficaz (Bouvier, 2003; Voelkl, Moore et al., 2009).

A principal função das células T CD4 é ativar outras células do sistema imune. As moléculas MHC de classe II são encontradas nos linfócitos B, nas células dendríticas e nos macrófagos. Quando as células T CD4 reconhecem peptídeos ligados a moléculas MHC de classe II nas células B, juntamente com moléculas ocorre o estímulo para a produção de anticorpos. Da mesma maneira, as células T CD4, reconhecendo peptídeos ligados às moléculas MHC de classe II nos macrófagos, ativam essas células para destruição do agente agressor (Fremont, Hendrickson et al., 1996). As células T CD4⁺ são capazes de direcionar a ativação e proliferação de células T CD4 virgens, de acordo com o perfil de citocinas expressas naquele meio que estão envolvidas em duas categorias funcionais: as células Th1, que ativam macrófagos, e as células Th2, ou células T auxiliares, que ativam a produção de anticorpos pelas células B (Villadangos, 2001; Williams, Peh et al., 2002).

1.3 SISTEMA IMUNE E CÂNCER

Sugere-se uma interação entre o sistema imune e o processo de carcinogênese e progressão tumoral, estando a resposta inata na primeira linha de defesa contra o câncer. Os elementos celulares dessa resposta incluem granulócitos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas (DC) e células natural killer (NK).

A imunidade adaptativa, que inclui a imunidade humoral e celular, evolui ao longo

de vários dias, refletindo a necessidade da ativação e expansão dos linfócitos que podem reconhecer antígenos associados ao tumor (TAA). A presença de anticorpos (Ac) e dos TAA, bem como de células efetoras inespecíficas e específicas, presentes na circulação periférica e no sítio tumoral de pacientes com câncer, tem sido frequentemente relatada. Essas células e os Ac são capazes de mediar a rejeição do tumor (Dranoff 2004; Dunn, Old et al., 2004).

Os tumores podem escapar do sistema imune, por uma variedade de mecanismos, e a capacidade de interferir com o número de células imunes antitumorais e/ou de subverter sua função é considerada uma das principais razões subjacentes ao fracasso do hospedeiro em controlar a supressão do tumor (Dunn, Old et al., 2004). A interação das células tumorais com o sistema imune desempenha papel decisivo no processo da carcinogênese (Dranoff, 2004). Estudos demonstram que infiltrados intratumorais de linfócitos, especialmente aqueles com células T CD8+, estão associados à redução de recorrência da doença e sobrevida prolongada em diversos tipos de câncer (Zhang, Conejo-Garcia et al., 2003).

A resposta adaptativa antitumoral é iniciada pelas DC, que capturam células tumorais e processam o antígeno para o MHC de classe I e II. As células DC migram para os gânglios linfáticos, e estimulam células T e B específicas para o antígeno. No microambiente tumoral, as DC podem ser ativadas por sinalização produzida por células tumorais necróticas. Ocorre, então, processo de maturação que inclui a expressão de múltiplas citocinas, resultando na resposta mediada pelas células T (Matzinger, 2002). A produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e VEGF, no microambiente tumoral, pode inibir a função dessas DC, inibindo a resposta efetora de células T e aumentando a função das células T reguladoras (Gabrilovich, 2004). Citocinas como a IL-2 tem seu espectro de atividades voltado para o crescimento e diferenciação de linfócitos T e B, promoção do

crescimento e maturação das células NK e DC (Minami, Kono et al., 1993; Taniguchi and Minami, 1993; Galatiuc, Gherman et al., 1995). Estudos têm evidenciado sua importância na redução de tumores sólidos (Jackaman, Bundell et al., 2003; Jackaman and Nelson).

A resposta adaptativa às células tumorais depende da apresentação de epitopos de antígenos no sítio de ligação de moléculas do MHC classe I. O principal mecanismo de morte das células tumorais por vias específicas, depende da ação de células T CD8⁺ que reconhecem antígenos apresentados no contexto do MHC classe I. Assim, mecanismos potenciais de evasão imune envolvem a queda da expressão dos genes do MHC classe I ou de qualquer componente envolvido nas etapas de processamento de antígenos e transporte de epitopos imunogênicos para a membrana plasmática (Zisman, Pantuck et al., 2000).

A imunovigilância é a capacidade do sistema imune de reconhecer um antígeno tumoral ou uma modificação no tecido envolvido, causando eliminação dos mesmos. Este mecanismo depende da interação dos sistemas imune inato e adaptativo com as células dendríticas apresentadoras de antígenos estimulando a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ tumor-específicas, atraindo-as para o local da neoplasia, onde reconhecem e destroem as células tumorais que expressam os antígenos específicos (Dunn, Old et al., 2004).

1.4 CÂNCER DE OVÁRIO E CITOCINAS

A alta taxa de mortalidade pelo EOC é um resultado de obstáculos técnicos para a detecção precoce da doença e uma alta prevalência de metástase à distância em fases tardias da doença (Jemal, Siegel et al., 2009). Esta última propriedade provavelmente ocorre pelo contato direto entre a superfície ovariana e a cavidade peritoneal e facilita

a disseminação precoce de células do câncer de ovário também auxiliado pelo fluxo do líquido peritoneal (Naora and Montell, 2005). Ao contrário da maioria de outros órgãos, o epitélio da superfície do ovário é uma continuação natural do revestimento peritoneal e, portanto, está diretamente exposto à agressões metabólicas sobre o peritônio, a maioria das quais têm propriedades inflamatórias. O processo ovulatório é responsável por desencadear reações inflamatórias e com potencial mutagênico (Bonello, McKie et al., 1996). Este evento culmina em uma explosão de células epiteliais seguida por extrusão rápida do óvulo, ferindo a superfície ovariana (Murdoch, 1996).

A ovulação, juntamente com as etapas de reparo imediatamente após a liberação do óvulo, são marcados pela geração de um grande número de citocinas e enzimas modeladoras da matriz tecidual, incluindo prostaglandinas, eicosanóides bioativos, fatores ativadores de plasminogênio, collagenases, quimiocinas, fatores de necrose tumoral e vários fatores de crescimento, caracterizando a criação de um ambiente pró-inflamatório, caracterizado na teoria da ovulação incessante (Espey, 1992; Espey, 1994). Estudos têm demonstrado que a elevação de estrogênios e androgênios, como proposto pelas hipóteses da gonadotrofina e hormonal, respectivamente, amplifica a resposta imune através do recrutamento de células pró-inflamatórias e efetores moleculares (Orvieto, Fisch et al., 2005; Shan and Liu, 2009). Pela hipótese da tumorigênese na tuba uterina, o fluxo menstrual retrógrado carrega uma série de substâncias inflamatórias como as citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α , que em contato com a área fimbrial de transição entre o tecido mesquimal e o epitélio colunar poderia desencadear processos mutagênicos que resultariam no câncer (McGee, Jensen et al., 1999; Maisey, Nardocci et al., 2003; Strandell, Thorburn et al., 2004).

Ness e Cottreau propôs que a inflamação crônica pode levar ao desenvolvimento de câncer de ovário epitelial câncer (Ness and Cottreau, 1999). Eles propuseram a hipótese

de que fatores como exposição ao talco, endometriose e doença inflamatória pélvica poderiam aumentar o risco pelo processo de inflamação local do epitélio do ovariano. Estudos envolvendo um perfil populacional propenso ao processo de inflamação gonadal crônica mostraram maiores riscos para o desenvolvimento do câncer de ovário (Olson, Cerhan et al., 2002; Baan, Straif et al., 2006; Wu, Pearce et al., 2009).

O câncer de ovário apresenta alto potencial inflamatório, evidenciado pela presença de infiltrados linfocitários (TILs) no seu microambiente, os quais se relacionam diretamente à sobrevida das pacientes. O fluxo e as atividades destes infiltrados linfocitários são mediados por citocinas, sendo estas um reflexo do estado imunológico do hospedeiro, podendo servir como meio de se entender a resposta imune (Zhang, Conejo-Garcia et al., 2003; Raspollini, Castiglione et al., 2005).

A neoplasia ovariana é conhecida por criar um microambiente de supressão da resposta imune, a fim de escapar dos mecanismos de controle imunológico (Kandalaft, Powell et al.; Yigit, Figdor et al.). Uma das formas de escape da imunovigilância seria então, desviar a resposta imune do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α) para resposta Th2 (IL-4, IL-6) (Giuntoli, Webb et al., 2009). A resposta Th1 atua pelo estímulo da imunidade celular por ativação de macrófagos e células dendríticas e no recrutamento de células T CD8+ citotóxicas e células NK. A resposta Th2 inibe a imunidade mediada por células e favorece a resposta imune humoral. A geração e perpetuação de um perfil de resposta imune dependerão do padrão e equilíbrio das citocinas envolvidas no processo de maturação das células virgens (Sers, Husmann et al.).

Outros perfis mais recentes de resposta imune mediados por determinadas classes de citocinas também têm sido relatados, tais como as células Th17 recém-identificadas como estimuladoras de células T CD4. Células Th17 e seu produto, a citocina IL-17

desempenham um papel ativo na inflamação e nas doenças auto-imunes e também são encontradas em tumores humanos (Ouyang, Kolls et al., 2008); (Kryczek, Wei et al., 2007). Nestas condições, pela ação sinérgica entre IL-17 e IFN- γ , as células Th17 são capazes de recrutar células T efetoras no ambiente tumoral, contribuindo com uma resposta favorável à destruição das células malignas pelo estímulo à produção de citocinas Th1. A inibição de células Th17 representa portanto, um mecanismo de evasão tumoral à resposta imune (Kryczek, Banerjee et al., 2009).

A citocina IL-4 é peça fundamental no desenvolvimento da resposta imune Th2 e está envolvida na mediação de inúmeras atividades imunomoduladoras como a sobreposição da resposta Th2 e inibição da atividade Th1, a produção de anticorpos IgG, IgE e alteração na expressão de moléculas MHC II (Nelms, Keegan et al., 1999). Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando o bloqueio de receptores de IL-4 por meio de anticorpos monoclonais, em algumas linhagens do câncer de ovário, têm mostrado importante regressão tumoral. (Kawakami, Kawakami et al., 2001; Kioi, Takahashi et al., 2005)

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma proteína transmembrana com um potencial de sinalização tanto como proteína de membrana integrada quanto como citocina solúvel liberada após clivagem proteolítica. Seu envolvimento no controle ou proliferação tumoral não está bem definido. Ao que parece, estas funções se alternam na dependência da ligação desta citocina a determinado tipo de receptor. (Hehlhans and Pfeffer, 2005) Assim, a ativação de vias que utilizem certo tipo de receptor (TRAF2), contribui para o processo de exacerbação da inflamação e de imortalização celular. Por meio de enzimas proteolíticas como as caspases, o TNF- α é capaz de desencadear uma cascata de reações que culminam na apoptose da célula tumoral (Balkwill, 2006; Balkwill, 2009)

A citocina solúvel IFN- γ possui numerosos efeitos antitumorais no câncer de ovário,

principalmente pela diminuição da expressão de oncogenes e indução da superexpressão genes supressores do tumor (Marth, Muller-Holzner et al., 1990; Burke, Smith et al., 1999; Sers, Husmann et al., 2002). Resultados recentes indicam que o IFN- γ apresenta efeitos proapoptóticos diretos pela interação com o TNF- α (Meng and El-Deiry, 2001).

Outra forma de evasão da apoptose pelas células tumorais no câncer de ovário, ocorre por modificações estruturais (perda de antígenos, perda de componentes MHC ou insensibilidade ao IFN- γ) ou pelo aumento na produção de citocinas com ação imunossupressora como a IL-10 (Dunn, Old et al., 2004). Esta citocina age inibindo a produção e o funcionamento das células efetoras da resposta imune por meio de mecanismos como supressão direta da capacidade das células apresentarem antígenos ou desvio da resposta Th1 para Th2 (Monti, Leone et al., 2004). A IL-10 também altera a diferenciação, a maturação e a função das células dendríticas (DCs), aumentando sua apoptose espontânea e interferindo na indução da resposta antitumoral (Corinti, Albanesi et al., 2001). Além disso, a IL-10 protege as células tumorais contra os linfócitos T citotóxicos (CTLs) pela diminuição na produção das moléculas MHC I e II (Yue, Dummer et al., 1997).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória relacionada à proliferação desordenada de tumores epiteliais, sendo também produzida pelas células tumorais (Okamoto, Lee et al., 1997; Torres, Ponnusamy et al., 2009), com evidências de sua atuação no desenvolvimento e progressão do câncer de ovário (Nilsson, Langley et al., 2005).

1.5 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O CEO representa, ainda hoje, um grande desafio pela limitação dos métodos de rastreamento e opções terapêuticas realmente eficazes que implicam em baixa sobrevida. Diante dessa lacuna existente no cenário atual, muito se tem pesquisado sobre os mecanismos envolvidos no complexo processo da carcinogênese ovariana. Apesar das evidências de escape tumoral à imunovigilância, a real função do sistema imune no controle do CEO não está bem estabelecida. Dessa forma, esse estudo visa avaliar o perfil sistêmico e o microambiente tumoral por uma das principais peças-chave envolvidas na estruturação, modelagem e direcionamento da resposta imune – as citocinas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta Th1, Th2 e Th17, por meio da dosagem de citocinas, em mulheres com CEO.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ no soro e tumor/ovário normal em mulheres com CEO e com o grupo controle.
- Comparar as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ no soro, tumor, líquido intracístico e ascite em mulheres com CEO.
- Avaliar a associação das concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ no soro, tumor, líquido intracístico e ascite com a dosagem serica do CA-125 e fatores prognósticos em mulheres com CEO.
- Avaliar a associação das concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ no soro, tumor, líquido intracístico e ascite com a recorrência tumoral e sobrevida em mulheres com CEO.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram avaliadas prospectivamente 44 mulheres com diagnóstico de CEO nos estágios I a IV (casos) e 32 mulheres submetidas à histerectomia abdominal total com ooforectomia para tratamento de doença ginecológica benigna (grupo controle), atendidas no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de novembro de 2008 a julho de 2010, com diagnóstico histopatológico confirmado no pós-operatório. Foram realizados exames clínico, ginecológico e ultrassonografia transvaginal em todas as pacientes. O estadiamento do CEO foi estabelecido após laparotomia, segundo protocolo e classificação pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Anexo I) (Benedet, Bender et al., 2000).

Todos os tecidos removidos durante a operação foram examinados por um único patologista. O critério de citorredução ótima foi definido como a permanência de doença residual menor que 1 cm de diâmetro, após a cirurgia primária. Os níveis séricos do marcador tumoral CA-125 foram obtidos, previamente à operação, em todas as mulheres com CEO. A progressão da doença foi definida pela elevação dos níveis séricos do CA-125 ≥ 35 U/mL em duas ou mais ocasiões, pela documentação de aumento/surgimento de lesões à Tomografia Computadorizada ou Ressonância Nuclear Magnética e óbito em decorrência do tumor de ovário (Rustin, Timmers et al., 2006).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o parecer de n. ETIC 326/08 (Anexo II). As pacientes foram esclarecidas sobre o protocolo de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III).

3.1.1 Critérios de inclusão

- Mulheres com diagnóstico anatomopatológico de CEO submetidas a tratamento cirúrgico (casos);
- Mulheres submetidas à histerectomia abdominal total com ooforectomia para tratamento de doença ginecológica benigna e sem evidências de neoplasias malignas (grupo controle);
- Ausência de processo infeccioso agudo peritoneal evidente à laparotomia;
- Pacientes sem evidência de processo inflamatório agudo sistêmico;
- Pacientes sem tratamento prévio por quimioterapia e/ou radioterapia;
- Pacientes que não estavam em uso de imunossupressores, corticosteróides e/ou antiinflamatórios não esteróides há pelo menos 3 meses;
- Termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

3.1.2 Técnica cirúrgica

As pacientes com CEO foram submetidas à laparotomia mediana ampla, inventário da cavidade peritoneal, lavado peritoneal, histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral, omentectomia, linfadenectomia pélvica e para-aórtica quando indicada, além dos

procedimentos necessários à realização de citorredução ótima, quando possível (resseção intestinal, hepatectomia parcial, apendicectomia, peritonietomia, dentre outros).

3.2 MÉTODO

3.2.1 Avaliação histológica

As peças cirúrgicas retiradas foram fixadas imediatamente com formaldeído a 10%. O material foi identificado numericamente e encaminhado para avaliação anatomopatológica. As amostras fixadas em formaldeído foram desidratadas em etanol em concentrações crescentes, variando de 70% a 99% (60 min. cada); depois imersas em xilol (2 x 60 min.) e em parafina 60° (2 x 60 min.); e incluídas em blocos de parafina. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), sendo o tipo histológico, o grau de diferenciação tumoral e a presença de metástases classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Benedet, Bender et al., 2000). Todos os tumores foram classificados como cistadenocarcinomas serosos do ovário.

3.2.2 Obtenção das amostras para dosagem de citocinas

Foram coletados no pré-operatório, antes da indução anestésica, sangue periférico em tubos a vácuo de 5 mL, contendo anticoagulante EDTA-K3 (Vacutainer, Becton Dickinson, BD, EUA) e amostras de tumor/ovário normal, líquido intracístico e ascite, no intra-operatório, para a realização do ensaio da dosagem de citocinas. Frações de tumor/

ovário normal foram solubilizadas e o sobrenadante utilizado para dosagem das citocinas. Após a coleta do material, os tubos foram invertidos de 4 a 6 vezes para a homogeneização perfeita, e armazenados em temperatura ambiente (20 a 25°C).

O soro foi conservado, utilizando-se anticoagulante EDTA-K3 (ácido etileno-diamino tetracéico) 1,5 +/- 0,15 mg/mL preparado por técnica de marcação direta e *glyse/wash h* e as amostras de líquido intracístico, ascite e tumor a fresco, congeladas no *freezer* a -80°C.

3.2.3 Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ

A avaliação das citocinas, em substituição à dosagem por ELISA – técnica mais utilizada para mensurar amostras solúveis – foi realizada com o método CBA (Morgan, Varro et al., 2004). O Kit CBA mescla as tecnologias no ELISA com a citometria de fluxo. O uso de esferas de poliestireno, marcadas com diferentes graus de intensidade, como suporte para a reação de imunofluorescência facilita a análise quantitativa de múltiplos parâmetros em uma única amostra, utiliza mínimos volumes de material para obter seus resultados, produz dados com reprodutibilidade comparável a outras técnicas, como ELISA, permite comparação direta com ensaios já existentes e avaliação mais rápida de múltiplas amostras em uma mesma plataforma (Carson and Vignali, 1999; Pei, Lee et al., 1999; Pierangeli, Silva et al., 1999; Lund-Johansen, Davis et al., 2000).

Com o desenvolvimento da técnica e automatização de seus processos junto à possibilidade de livre associação dos parâmetros para estudo, o Kit CBA ganha ainda mais em agilidade, ampliando sua possibilidade de inserção na abordagem clínica diária. Painéis de marcadores bioquímicos poderiam ser avaliados de forma simultânea com seus

resultados podendo ser utilizados como biomarcadores na detecção de tumores iniciais e melhor avaliação do prognóstico individual.

Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ em amostras de soro, tumor/ovário normal, líquido intracístico e líquido ascítico.

A dosagem das citocinas foi realizada por meio da técnica Cytometric Bead Array (CBA) (BD, Pharmingen, EUA) que se baseia no uso de esferas de poliestireno marcadas com diferentes graus de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos, que são detectados nos canais FL3 ou FL4. Esse sistema permite uma análise quantitativa das citocinas marcadas com ficoeritrina em função do deslocamento dos grupamentos em FL2 obtidos por citometria de fluxo (Fig. 3.1).

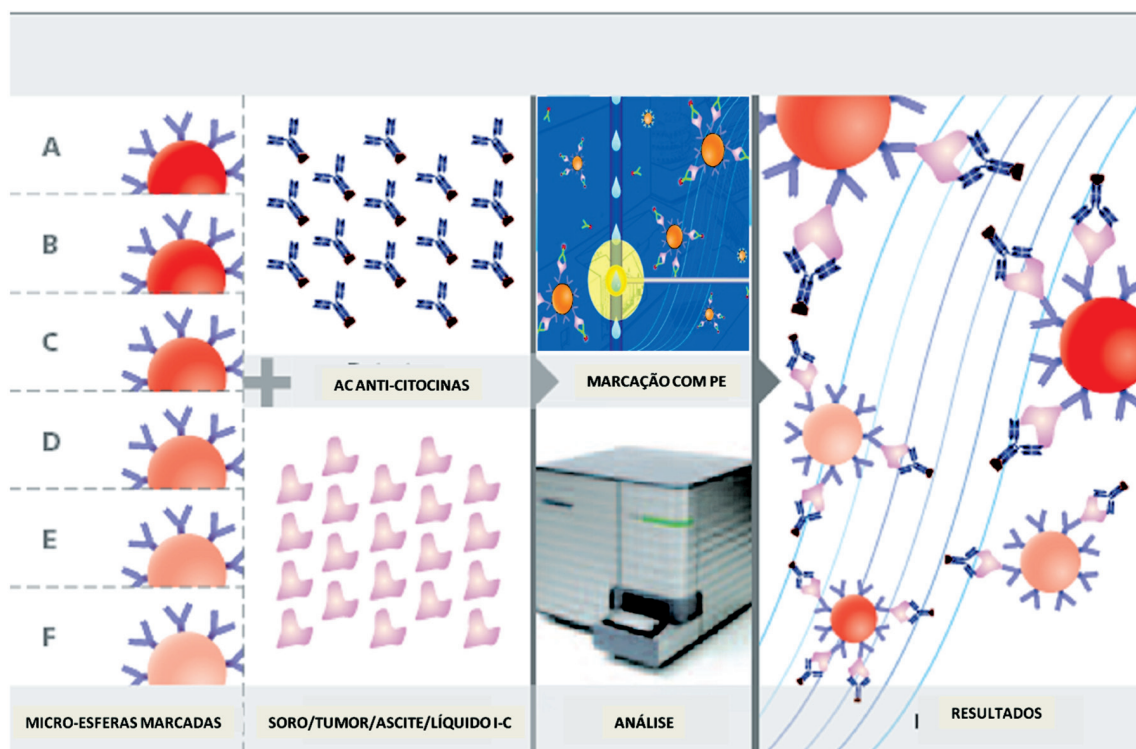


Figura 3.1. Representação esquemática da técnica de CBA.

Nota: Adaptado do bulário do Cytometric Bead Array Flex Set System BD – Biosciences, 2004-2005. Com as micro-esferas marcadas, foram adicionados aos anticorpos anti-citocinas, amostras de tumor, soro, líquido intracístico e ascite. Em seguida, a amostra foi marcada por imunofluorescência (ficoeritrina) e analisada no citômetro de fluxo. Os resultados foram obtidos por software específico para CBA (FCAP Array TM Software, BD, Pharmingen, EUA). Os anticorpos utilizados foram: Anti-IL2, Anti-IL4, Anti-IL6, Anti-IL10, Anti-IL17, Anti-TNF α e Anti-IFN- γ . Ac: Anticorpos; PE: Ficoeritrina; I-C: intracístico.

A metodologia CBA foi adaptada do protocolo original proposto pelo fabricante, com algumas modificações: alíquotas de 25 mL de amostra foram utilizadas e 25 mL dos padrões das citocinas submetidos à diluição seriada com diluente G do kit CBA. As amostras e os padrões foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL e foram adicionados 15 mL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, BD, Pharmingen, EUA; Catalog. n. 560484). Em seguida, 18 μ L do coquetel de anticorpos foram conjugados com ficoeritrina – PE e incubados por 3 horas, à temperatura ambiente. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos, a 18°C e o sobrenadante foi descartado (Fig. 3.2).

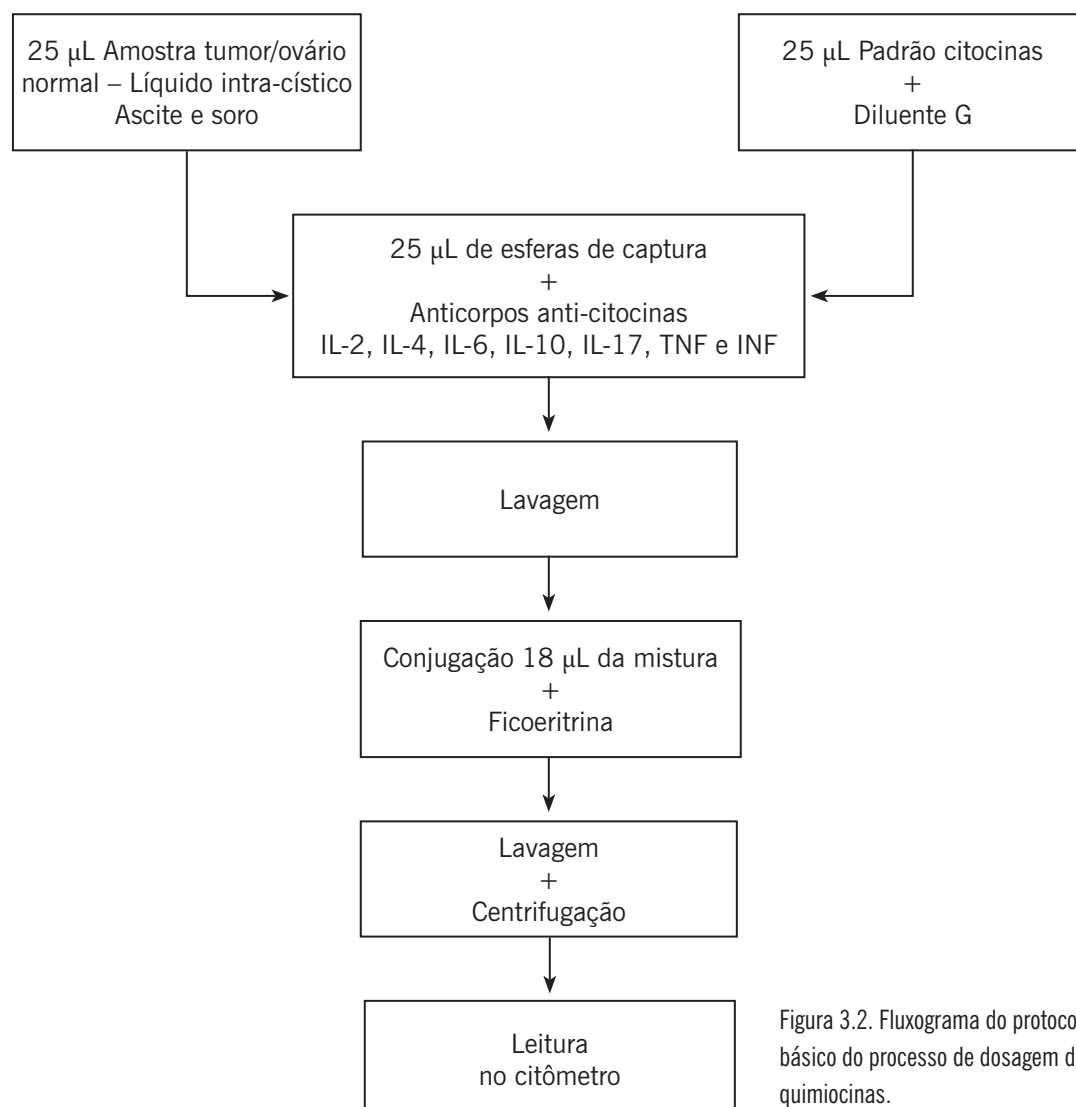


Figura 3.2. Fluxograma do protocolo básico do processo de dosagem das quimiocinas.

Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, E.U.A.) e analisados com auxílio do *software* específico para CBA (FCAP Array TM Software, BD, Pharmingen, EUA), por meio de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) obtidos na leitura da Fluorescência 2, sendo os resultados expressos em pg/mL (Fig. 3.3). As dosagens e os resultados encontram-se armazenados no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou e no Laboratório de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias do Estado de Minas Gerais. A Figura 3.4 ilustra a obtenção dos dados no presente estudo.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o *software* SPSS 18,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As variáveis contínuas foram calculadas utilizando média, mediana, desvio padrão (SD) e erro padrão da média (SEM). Para fins de análise estatística, as variáveis CA-125, IL-6, IL-10 e IFN- γ foram divididas em 2 grupos de acordo com a mediana. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o teste χ^2 e o teste exato de Fischer. O nível de significância foi estabelecido por $p < 0,05$. A comparação entre os grupos não pareados foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney (2 grupos) ou o teste de Kruskal-Wallis (3 grupos). As curvas de recidiva e sobrevida foram analisadas e desenhadas por *Cox Regression*.

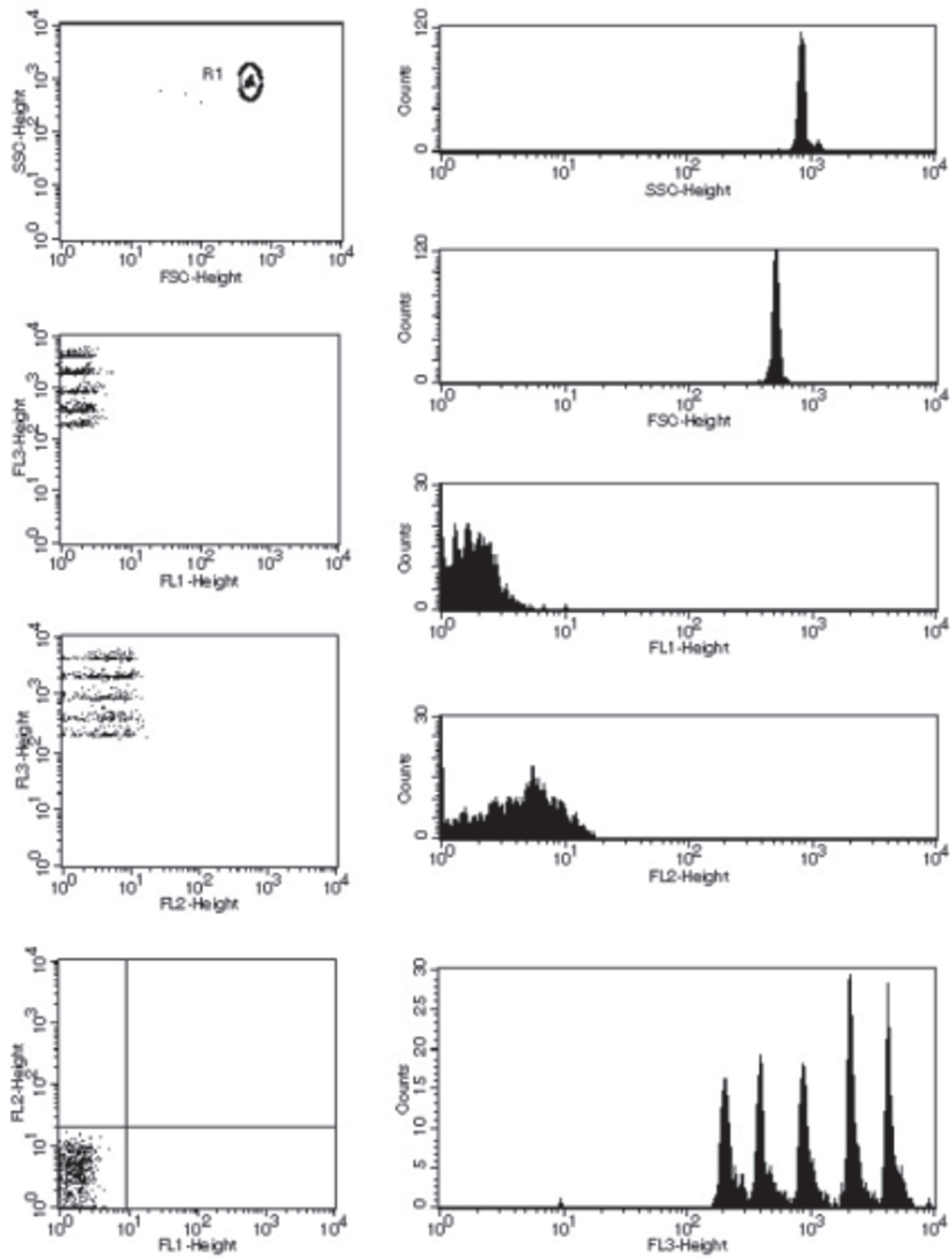


Figura 3.3: Modelo de aquisição dos dados no citômetro de fluxo pelo kit CBA/BD e leitura dos resultados em pg/mL.

Nota: Determinação da região da população de *beads* através de gráficos de distribuição pontual estratificadas por diferenças de tamanho *versus* granulosidade. Marcadas por fluorescência.

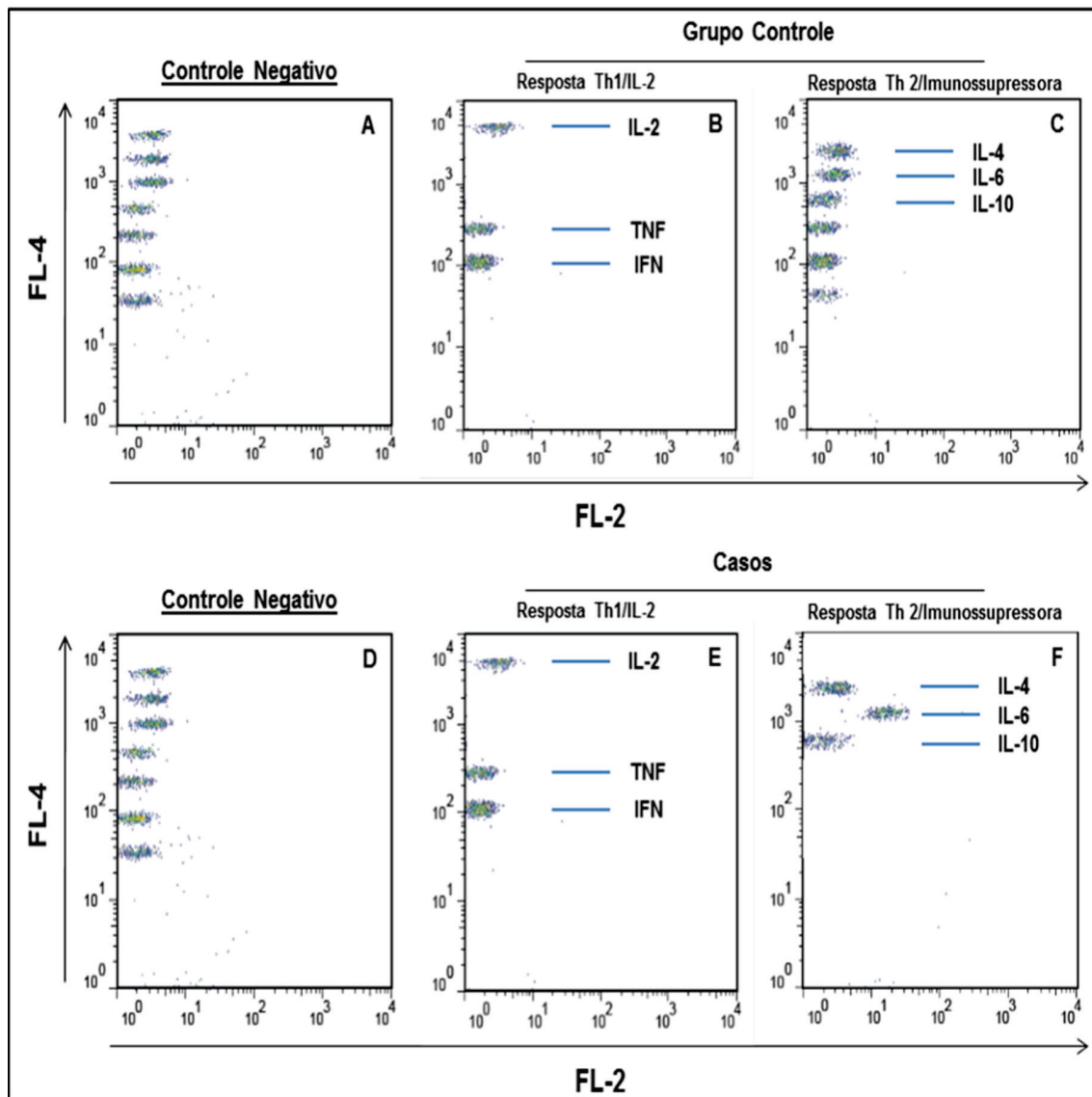


Figura 3.4: Gráfico do tipo “pseudocolor” das concentrações das citocinas obtidas por citometria de fluxo na plataforma de *beads* no sistema CBA.

Nota: Determinação da região da população de *beads* através de gráficos de distribuição pontual estratificadas por diferenças na fluorescência. (A) e (D): Controles negativos. (B), (C), (E) e (F): Discriminação das *beads* conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas, projetadas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL-4) em gráficos de distribuição pontual FL-2 versus FL-4. Deslocamento das *beads*, ao longo do eixo X (FL-2) em gráficos de distribuição pontual FL-2 versus FL-4, proporcional à concentração de cada citocina nos grupos avaliados.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA

As mulheres apresentavam idade média de $60,2 \pm 11,1$ anos (variando de 33 a 78 anos) e paridade que variou de 0 a 6 partos (média de $2,1 \pm 0,6$ partos) (Tab. 4.1). Não houve diferenças entre os grupos em relação à idade e paridade ($p = 0,135$ e $p = 0,256$, respectivamente).

No grupo de mulheres com CEO, 12 (27,2%) apresentavam estágios I/II e 32 (72,7%) estágios III/IV. Entre essas pacientes foi evidenciada ascite em 38 (86,3%) e líquido intracístico em 20 (45,5%). Duas pacientes apresentavam grau I (4,5%) de diferenciação tumoral, 26 grau II (59,5%) e 16 grau III (36%). Houve uma associação entre o grau de diferenciação tumoral e o estadiamento, com um maior percentual de pacientes em estágios III/IV apresentando tumores G2 e G3 ($p = 0,001$) (Tab. 4.1). Ocorreu citorredução ótima nas 12 pacientes com estágios I/II. Nos estágios III/IV a citorredução foi satisfatória em apenas 10 (31,2%) das 32 (73%) pacientes com CEO. Não se observou recorrência ou óbito nos estágios I/II, e nos estágios III/IV houve 18 recidivas (56,3%) e 14 óbitos (43,7%), em um tempo médio de seguimento de 18 meses.

Tabela 4.1: Características gerais da amostra.

	Ovário normal n = 32	CEO n = 44		p
		Estágios I/II n = 12	Estágios III/IV n = 32	
Idade	62,3 ± 1,4	54,7 ± 1,5	60,1 ± 1,3	0,135
Paridade	2,1 ± 0,3	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	0,236
CA-125 (U/mL)	—	327,2 (82,3 – 3195)	353,2 (48,7 – 605)	0,699
Grau de diferenciação				0,001
G1	—	2 (16,7%)	0	
G2	—	10 (83,3%)	16 (50%)	
G3	—	0	16 (50%)	
Citorredução				0,001
Ótima (< 1 cm)	—	12 (100%)	10 (31,2%)	
Sub-ótima (> 1 cm)	—	0	22 (68,8%)	
Recorrência				0,001
Não	—	12 (100%)	14 (43,8%)	
Sim	—	0	18 (56,3%)	
Mortalidade				0,003
Não	—	12 (100%)	18 (56,3%)	
Sim	—	0	14 (43,7%)	

Nota: Para idade e paridade foi calculada a média ± erro padrão da média. O estadiamento cirúrgico foi realizado de acordo com os critérios adotados pela FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia – 1994). CA-125: marcador sérico para tumores epiteliais de ovário mensurado em U/mL. Foi considerada citorredução satisfatória a presença de tumor residual < 1 cm após a cirurgia primária. G1 – tumor bem diferenciado; G2 – tumor moderadamente diferenciado; G3 – tumor indiferenciado. CEO: Câncer Epitelial de Ovário. As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste *t de Student* e as comparações entre grupos pelo teste do *Qui-quadrado*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS

Níveis de IL-17 foram detectados na ascite em 6 (15,7%) amostras e no líquido intracístico em 2 (10%) amostras de mulheres com CEO. Não foram detectadas concentrações de IL-17 nas amostras de tumor e soro dos casos. No grupo controle a IL-17 foi detectada em apenas 5 (15%) amostras de soro e em nenhuma amostra de tecido ovariano normal. Dessa forma, optou-se por exclusão dessa citocina na análise dos resultados. O percentual de detecção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 nas pacientes com CEO foi acima de >90% no tumor, líquido ascítico, líquido intracístico e soro.

4.3 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DAS CITOCINAS IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α E IFN- γ NO TUMOR, LÍQUIDO INTRACÍSTICO, ASCITE E SORO DAS PACIENTES COM CEO

Observou-se a ocorrência de maiores concentrações de todas as citocinas, no ambiente tumoral, principalmente na ascite e no líquido intracístico, comparadas às concentrações séricas. Com o TNF- α esta associação foi mais evidente ($p < 0,001$). As concentrações das citocinas IL-6 ($p < 0,001$) e IL-10 ($p < 0,001$) no líquido ascítico, foram significativamente maiores, quando comparadas aos demais sítios (tumor, líquido intracístico e soro), como ilustrado na Figura 4.1.

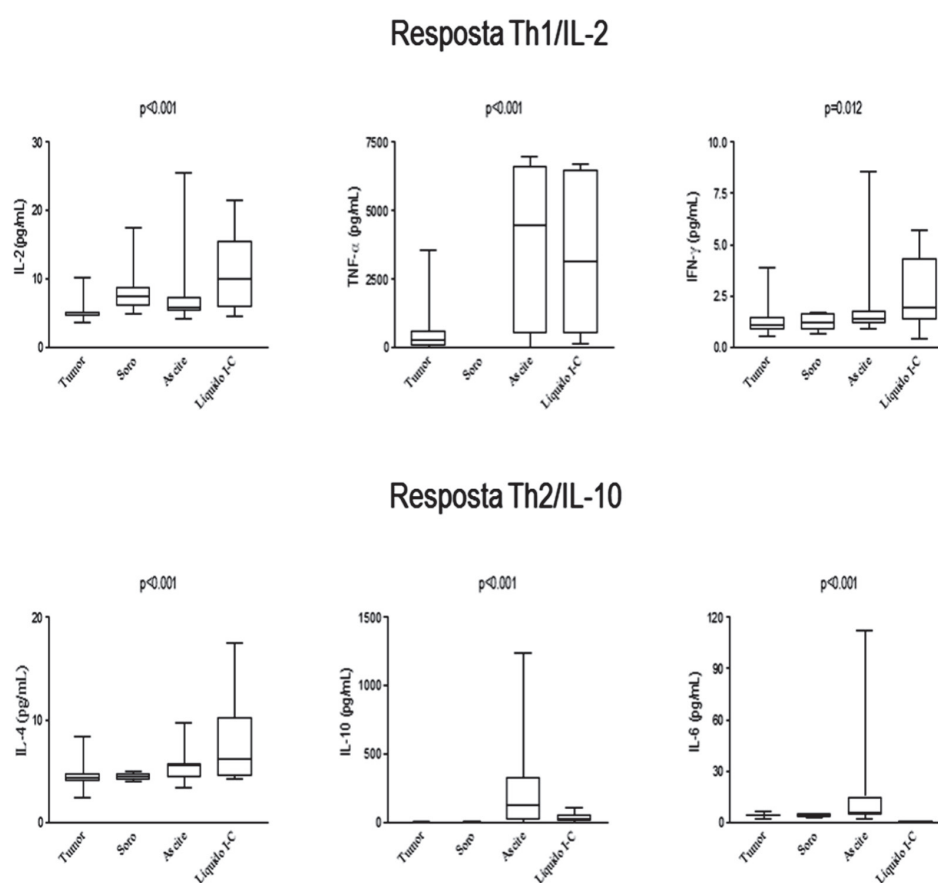


Figura 4.1. Perfil de distribuição das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α no tumor, líquido intracístico, líquido ascítico e soro de pacientes com câncer epitelial de ovário.

Nota: Foram calculadas mediana (percentil 50) e percentis 25 e 75 para cada citocina nos 4 sítios avaliados. As concentrações das citocinas foram mensuradas em pg/mL. As comparações entre grupos foram calculadas pelo teste do *Qui-quadrado*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. I-C = Intracístico; IL- = Citocina; IFN- = Interferon; TNF- = Fator de necrose tumoral; CEO = Câncer epitelial de ovário.

4.4 CEO *VERSUS* GRUPO CONTROLE

As concentrações das citocinas TNF- α ($p < 0,001$), IL-4 ($p < 0,001$), IL-6 ($p = 0,018$) e IL-10 ($p < 0,001$) no tumor, e os níveis séricos de TNF- α ($p = 0,048$) foram significativamente mais elevados em pacientes com CEO que no grupo controle. Não se observaram diferenças nos níveis séricos de IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10 entre casos e controles. As dosagens de IL-2 ($p < 0,001$) no soro e IFN- γ ($p = 0,024$) no tumor foram mais elevadas no grupo controle (Tab. 4.2).

Tabela 4.2. Comparação das concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no tumor e soro entre pacientes com CEO e grupo controle.

Citocina	Controle	CEO	p
<i>Tumor</i>			
IL-2	4,7 (4,1 – 5,1)	4,7 (4,5 – 5,1)	0,863
IFN-g	1,3 (0,9 – 2,0)	1,1 (0,9 – 1,5)	0,024
TNF-	3,1 (2,8 – 3,6)	275,3 (56,3 – 597,9)	$< 0,001$
IL-4	3,8 (3,7 – 4,1)	4,4 (4,0 – 4,8)	$< 0,001$
IL-6	3,5 (3,2 – 3,7)	4,0 (3,8 – 4,2)	0,018
IL-10	2,7 (2,5 – 3,0)	3,5 (2,9 – 5,6)	$< 0,001$
<i>Soro</i>			
IL-2	7,7 (7,6 – 9,8)	7,4 (6,1 – 8,8)	0,001
IFN-g	1,3 (1,1 – 1,6)	1,2 (0,9 – 1,6)	0,151
TNF-	4,2 (4,1 – 4,4)	23,5 (9,2 – 42,7)	0,048
IL-4	4,1 (4,0 – 4,2)	4,5 (4,1 – 4,8)	0,199
IL-6	3,5 (3,3 – 4,5)	3,6 (3,4 – 5,1)	0,083
IL-10	3,7 (3,4 – 4,4)	4,8 (3,7 – 4,9)	0,113

Nota: Foram calculadas mediana (percentil 50) e percentis 25 e 75 para cada citocina nos quatro sítios avaliados. Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. A comparação entre os grupos não pareados foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. IL- = Citocina; IFN- = Interferon; TNF- = Fator de necrose tumoral; CEO = Câncer epitelial de ovário.

4.5 Citocinas *versus* fatores prognósticos em pacientes com CEO

As concentrações da citocina IL-10 na ascite ($p = 0,003$) e no tumor ($p < 0,047$) foram mais elevadas em pacientes nos estágios III/IV. As concentrações do TNF- α na

ascite ($p = 0,028$) e no soro ($p = 0,027$), foram maiores nos estágios III/IV. Os níveis de IL-4, IL-6 e IL-10 na ascite e líquido intracístico não mostraram diferenças quanto ao estadiamento (Tab. 4.3).

A análise dos níveis das citocinas mostrou maiores concentrações séricas de IL-6 ($p = 0,035$) e IL-10 ($p = 0,048$), maiores níveis de IL-4 ($p < 0,001$), IL-6 ($p = 0,005$) e IL-10 ($p < 0,001$) no tumor, maiores valores de IL-10 ($p = 0,030$) no líquido intracístico e maiores concentrações das citocinas IL-10 ($p = 0,017$) e IL-4 ($p = 0,033$) na ascite, em pacientes com CEO submetidas à laparotomia com citorredução insatisfatória. Observou-se também predomínio de maiores concentrações no perfil de resposta Th1, quando a citorredução foi considerada ótima. Foram mensurados níveis mais elevados de IFN- γ ($p < 0,001$) no tumor e de IL-2 ($p < 0,001$) no soro das pacientes submetidas à citorredução satisfatória (Tab. 4.3).

As concentrações das citocinas nos 4 sítios, comparadas à citorredução na cirurgia primária, mostraram uma associação entre citocinas Th2 e imunossupressoras e os tumores indiferenciados. Ocorreram concentrações mais elevadas de IL-10 na ascite ($p = 0,033$) e líquido intracístico ($p = 0,028$), de IL-6 no líquido intracístico ($p = 0,031$) e no tumor ($p = 0,010$) e de IL-4 no tumor ($p = 0,040$) (Tab. 4.3).

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α E IFN- γ E OS NÍVEIS SÉRICOS DO MARCADOR CA-125, NOS DIFERENTES SÍTIOS (TUMOR, LÍQUIDO INTRACÍSTICO, ASCITE E SORO) NAS PACIENTES COM CEO

Ocorreu uma associação entre níveis elevados do CA-125 e maiores concentrações de IL-10 no líquido intracístico ($p = 0,004$). Níveis séricos elevados de TNF- α foram associados a maiores valores de CA-125 (Tab. 4.4).

Tabela 4.3: Comparação entre as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , e os fatores prognósticos, estadiamento, citorredução na cirurgia primária e grau de diferenciação tumoral nos diferentes.

Citocina	Estadiamento		Citorredução ótima		Grau de diferenciação			p		
	Estágios I/II	Estágios III/IV	p	Não	Sim	p	I		II	III
Ascite										
IL-2	4,7 (4,6 – 5,0)	4,9 (4,0 – 6,2)	0,371	6,1 (4,6 – 13,8)	5,9 (5,3 – 7,0)	0,859	—	5,9 (5,7 – 10,7)	6,1 (4,5 – 7,3)	0,554
IFN-g	1,1 (0,9 – 1,5)	0,9 (0,8 – 1,1)	0,063	1,3 (1,1 – 2,3)	1,4 (1,2 – 1,8)	0,859	—	1,3 (1,1 – 1,7)	1,4 (1,2 – 2,5)	0,086
TNF- α	106,4 (23,5 – 395,8)	335,1 (61,1 – 597,9)	0,028	6207,2 (4215,9 – 6610,7)	778,9 (67,9 – 5669,2)	0,012	—	3717,1 (512,9 – 6319,9)	6235,3 (1576,6 – 6610,7)	0,155
IL-4	4,3 (4,0 – 5,7)	4,40 (4,0 – 4,5)	0,309	5,6 (5,2 – 5,9)	4,9 (4,2 – 5,5)	0,033	—	5,6 (4,4 – 5,6)	5,4 (4,4 – 5,9)	0,859
IL-6	3,9 (3,5 – 4,1)	4,1 (3,3 – 5,1)	0,309	5,7 (3,9 – 22,9)	6,5 (4,8 – 14,9)	0,492	—	6,1 (4,1 – 11,5)	8,36 (4,5 – 29,1)	0,554
IL-10	3,0 (2,9 – 4,8)	3,6 (3,1 – 5,6)	0,003	178,5 (61,6 – 561,3)	46,60 (3,8 – 255,3)	0,017	—	82,9 (10,3 – 310,9)	214,9 (66,8 – 654,3)	0,033
I-C										
IL-2	7,4 (6,1 – 8,8)	5,4 (4,5 – 6,1)	0,284	10,9 (8,3 – 16,8)	6,4 (5,1 – 14,8)	0,284	—	11,8 (10,1 – 18,5)	6,4 (5,1 – 14,8)	0,316
IFN-g	1,2 (0,9 – 1,4)	0,9 (0,8 – 0,9)	0,721	1,7 (1,3 – 4,3)	2,2 (1,1 – 4,1)	0,617	—	1,97 (1,4 – 5,1)	2,22 (1,1 – 4,1)	0,225
TNF- α	8,6 (8,0 – 9,5)	31,0 (12,2 – 42,7)	0,721	3261,2 (254,1 – 6493,1)	3132,9 (1894,4 – 6420,7)	0,617	—	5961,1 (561,3 – 6670,4)	3132,9 (1894,4 – 6420,7)	0,066
IL-4	4,5 (4,4 – 4,8)	4,6 (4,4 – 4,9)	0,284	8,1 (4,8 – 15,7)	6,2 (4,5 – 7,3)	0,284	—	6,2 (4,5 – 7,3)	10,3 (5,8 – 17,4)	0,040
IL-6	3,8 (3,4 – 5,1)	4,2 (3,6 – 6,7)	0,721	8,9 (4,1 – 13,8)	7,6 (5,8 – 11,1)	0,721	—	7,6 (5,8 – 11,1)	12,1 (5,7 – 14,4)	0,031
IL-10	4,3 (3,7 – 4,8)	5,0 (4,3 – 5,8)	0,153	38,6 (10,4 – 82,8)	25,5 (7,6 – 32,9)	0,030	—	18,9 (32,1 – 33,1)	38,6 (10,4 – 82,8)	0,028
Tumor										
IL-2	10,9 (8,3 – 16,8)	6,4 (5,1 – 14,8)	0,931	4,8 (4,2 – 6,16)	4,6 (4,5 – 5,0)	0,693	—	4,7 (4,0 – 4,9)	4,7 (4,5 – 5,6)	0,646
IFN-g	2,2 (1,3 – 4,6)	1,7 (1,1 – 4,1)	0,730	1,1 (0,9 – 1,4)	1,4 (0,8 – 1,9)	0,007	—	0,9 (0,7 – 1,4)	1,3 (1,0 – 1,7)	0,104
TNF- α	3261,2 (254,0 – 6493,1)	3132,9 (1894,4 – 6420,6)	0,121	292,5 (47,3 – 547,2)	56,3 (191,8 – 841,9)	<0,001	—	292,5 (27,6 – 517,6)	293,4 (58,5 – 780,9)	0,561
IL-4	8,1 (4,8 – 15,1)	6,1 (4,5 – 7,3)	0,762	4,8 (4,0 – 5,5)	4,4 (3,8 – 4,8)	<0,001	—	4,4 (4,0 – 5,0)	4,3 (3,9 – 4,5)	0,207
IL-6	8,9 (4,7 – 13,8)	7,6 (5,8 – 11,1)	0,196	4,3 (3,5 – 5,1)	3,9 (3,5 – 4,8)	0,005	—	3,7 (3,5 – 4,0)	4,3 (4,1 – 4,9)	0,010
IL-10	25,5 (7,6 – 32,9)	38,6 (10,4 – 82,8)	0,047	3,7 (3,1 – 6,6)	3,2 (2,8 – 4,6)	<0,001	—	2,9 (2,7 – 6,6)	3,6 (3,2 – 5,4)	0,175
Soro										
IL-2	5,8 (4,8 – 12,9)	6,3 (4,2 – 6,8)	0,463	7,3 (5,8 – 10,9)	7,5 (7,4 – 7,7)	<0,001	—	7,4 (6,1 – 8,8)	7,1 (6,4 – 8,2)	0,143
IFN-g	1,4 (0,93 – 3,2)	1,0 (0,9 – 1,8)	0,141	1,0 (0,9 – 1,2)	1,3 (0,9 – 1,6)	0,955	—	1,3 (0,9 – 1,6)	0,8 (0,6 – 1,1)	0,246
TNF- α	1045,0 (118,4 – 5018,5)	5572,06 (636,80 – 6610,69)	0,027	23,5 (4,2 – 42,7)	23,5 (11,5 – 41,1)	0,955	—	23,5 (9,2 – 42,7)	19,5 (8,5 – 36,3)	0,568
IL-4	4,8 (4,0 – 6,7)	5,6 (4,8 – 5,7)	0,141	4,3 (4,1 – 4,5)	4,6 (4,3 – 4,8)	0,211	—	4,5 (4,1 – 4,8)	5,2 (3,3 – 8,1)	0,742
IL-6	5,4 (3,9 – 19,1)	6,4 (4,9 – 14,9)	0,462	3,9 (3,4 – 5,1)	3,2 (3,1 – 3,5)	0,035	—	3,6 (3,4 – 5,1)	4,1 (3,8 – 5,9)	0,079
IL-10	10,3 (4,3 – 88,4)	178,4 (61,6 – 561,3)	0,141	4,8 (3,8 – 4,9)	4,2 (3,5 – 4,9)	0,048	—	4,8 (3,9 – 4,9)	5,8 (4,2 – 6,3)	0,074

Nota: Foram calculadas mediana (percentil 50) e percentis 25 e 75 para cada citocina nos quatro sítios avaliados. Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. Foi considerada citorredução satisfatória a presença de tumor residual < 1 cm após a cirurgia primária. G1 = Tumor bem diferenciado; G2 = Tumor moderadamente diferenciado; G3 = Tumor indiferenciado. As A comparação entre os grupos não pareados foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney (2 grupos) ou o teste de Kruskal-Wallis (3 grupos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. I-C = Líquido intracáustico; IL- = Citocina; IFN- = Interferon; TNF- = Fator de necrose tumoral; CEO = Câncer epitelial de ovário.

Tabela 4.4. Comparação entre as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ e os níveis séricos do marcador tumoral CA-125 nos diferentes sítios (tumor, líquido intracístico, ascite e soro).

Citocina	CA-125		p
	< 350	\geq 350	
Ascite			
IL-2	5,7 (4,7 – 9,1)	5,9 (5,6 – 7,2)	0,445
INF-g	1,5 (1,2 – 2,1)	1,3 (1,1 – 1,4)	0,556
TNF- α	1045,0 (244,8 – 6731,7)	5572,1 (2176,9 – 6319,9)	0,638
IL-4	5,2 (4,2 – 5,6)	5,6 (4,8 – 6,1)	0,078
IL-6	6,9 (4,6 – 28,7)	5,4 (4,4 – 11,5)	0,158
IL-10	82,9 (10,3 – 49,5)	155,8 (37,9 – 310,9)	0,860
Líquido I-C			
IL-2	7,6 (6,4 – 10,1)	12,6 (5,3 – 18,5)	0,363
INF-g	1,9 (1,3 – 2,2)	3,5 (1,3 – 5,1)	0,363
TNF- α	2391,8 (151,6 – 5961,1)	6377,1 (561,3 – 6551,5)	0,069
IL-4	6,4 (4,5 – 17,4)	6,2 (4,6 – 10,1)	0,585
IL-6	11,2 (3,5 – 14,4)	7,6 (5,7 – 11,1)	0,716
IL-10	3,9 (3,8 – 18,9)	38,6 (32,1 – 73,9)	0,004
Tumor			
IL-2	4,7 (4,3 – 4,9)	4,9 (5,5 – 5,9)	0,121
INF-g	1,3 (0,9 – 1,4)	1,1 (0,9 – 1,7)	0,737
TNF- α	309,6 (56,3 – 557,8)	191,8 (46,9 – 654,3)	1,000
IL-4	4,4 (3,9 – 4,8)	4,3 (4,1 – 4,5)	0,867
IL-6	3,8 (3,5 – 4,1)	4,0 (3,3 – 4,9)	0,401
IL-10	3,5 (2,9 – 5,3)	3,5 (2,9 – 8,4)	0,742
Soro			
IL-2	7,4 (7,2 – 7,5)	7,7 (5,8 – 10,9)	0,569
INF-g	1,3 (1,2 – 1,3)	1,1 (0,8 – 1,6)	0,569
TNF- α	45,6 (42,7 – 48,6)	12,2 (7,9 – 27,3)	0,004
IL-4	4,5 (4,4 – 4,5)	4,6 (4,1 – 4,5)	0,569
IL-6	3,5 (93,4 – 3,6)	3,9 (3,4 – 5,1)	0,254
IL-10	4,2 (3,5 – 4,8)	4,8 (3,9 – 4,9)	0,254

Nota: Foram calculadas mediana (percentil 50) e percentis 25 e 75 para cada citocina nos quatro sítios avaliados. Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. CA-125 = marcador sérico para tumores epiteliais de ovário mensurado em U/mL. A comparação entre os grupos não pareados foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney (2 grupos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. I-C = Líquido intracístico; IL- = Citocina; IFN- = Interferon; TNF- = Fator de necrose tumoral; CEO = Câncer epitelial de ovário.

4.7 AVALIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS NOS DIFERENTES SÍTIOS E RECORRÊNCIA E SOBREVIDA DAS PACIENTES COM CEO

Não foi evidenciada associação entre as concentrações das citocinas nos diferentes sítios estudados e as taxas de sobrevida livre de doença (Tab. 4.5).

Tabela 4.5. Associação entre recorrência e sobrevida global e as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ na ascite, líquido intracístico, tumor e soro das pacientes com câncer epitelial de ovário.

Citocina	Recorrência			Óbito		
	Não	Sim	<i>p</i>	Não	Sim	<i>p</i>
Ascite						
IL-2	5,9 (5,4 – 7,4)	6,6 (5,2 – 9,8)	0,515	5,9 (5,1 – 7,9)	6,9 (5,7 – 7,9)	0,131
IFN-g	1,3 (1,1 – 1,7)	1,4 (1,2 – 2,3)	0,213	1,9 (1,2 – 2,5)	1,4 (1,1 – 1,5)	0,058
TNF α	3717,03 (225,7 – 6670,4)	5889,7 (1531,6 – 6523,9)	0,492	6132,7 (5717,1 – 6759,1)	6437,1 (6207,2 – 6852,9)	0,273
IL-4	5,3 (4,7 – 5,6)	5,6 (4,2 – 5,9)	0,477	5,3 (4,1 – 5,7)	5,6 (5,2 – 5,7)	0,131
IL-6	5,6 (3,9 – 23,6)	6,7 (4,9 – 14,1)	0,344	5,4 (4,1 – 6,6)	19,3 (11,7 – 33,8)	0,001
IL-10	82,9 (5,3 – 329,8)	167,1 (58,7 – 540,5)	0,155	82,9 (9,0 – 194,6)	290,7 (178,4 – 660,2)	0,004
I-C						
IL-2	10,9 (8,3 – 16,8)	6,4 (5,1 – 14,8)	0,284	8,9 (5,3 – 11,8)	12,6 (6,4 – 21,6)	0,132
IFN-g	1,7 (1,3 – 4,3)	2,2 (1,1 – 4,1)	0,721	3,5 (2,2 – 5,8)	1,4 (1,3 – 1,9)	0,008
TNF α	3261,2 (254,0 – 6493,1)	3132,9 (1894,4 – 6420,7)	0,721	1847,15 (402,2 – 5961,0)	6377,0 (2391,8 – 6551,5)	0,132
IL-4	8,1 (4,8 – 15,7)	6,2 (4,5 – 7,3)	0,284	5,2 (4,5 – 10,3)	6,4 (6,2 – 10,1)	0,291
IL-6	8,9 (4,1 – 13,8)	7,6 (5,8 – 11,1)	0,721	8,4 (4,1 – 12,1)	7,6 (6,4 – 11,2)	0,707
IL-10	25,5 (7,6 – 32,9)	38,6 (10,4 – 82,8)	0,152	32,6 (18,9 – 38,6)	12,5 (3,9 – 73,9)	0,452
Tumor						
IL-2	4,7 (4,6 – 5,3)	4,6 (4,5 – 5,1)	0,396	4,86 (4,39 – 5,43)	4,66 (4,60 – 4,73)	0,308
IFN-g	1,3 (0,8 – 1,6)	1,1 (1,0 – 1,4)	0,799	1,02 (0,86 – 1,43)	1,26 (1,05 – 1,73)	0,270
TNF α	309,6 (86,8 – 537,7)	128,5 (56,3 – 841,9)	1,000	191,82 (28,53 – 381,66)	456,28 (65,12 – 841,91)	0,062
IL-4	4,5 (3,9 – 4,9)	4,3 (4,0 – 4,4)	0,234	4,33 (4,03 – 4,28)	4,40 (3,87 – 4,50)	0,671
IL-6	4,09 (3,46 – 4,57)	3,8 (3,5 – 4,1)	0,149	4,14 (3,57 – 4,54)	3,73 (3,45 – 4,05)	0,040
IL-10	3,45 (2,86 – 5,37)	3,6 (3,1 – 5,7)	0,175	3,03 (2,86 – 4,31)	4,33 (3,53 – 5,55)	0,042
Soro						
IL-2	7,5 (5,5 – 8,5)	7,3 (6,1 – 17,4)	1,000	17,4 (12,6 – 21,4)	16,4 (11,2 – 18,7)	0,122
IFN-g	1,1 (0,9 – 1,6)	1,3 (0,6 – 1,6)	1,000	1,1 (0,9 – 1,3)	0,9 (0,6 – 1,1)	0,141
TNF α	31,0 (9,0 – 41,7)	12,2 (9,2 – 48,6)	1,000	31,0 (9,2 – 42,7)	27,2 (12,1 – 36,2)	0,459
IL-4	4,6 (4,2 – 4,9)	4,4 (3,9 – 4,6)	0,142	4,5 (4,4 – 4,9)	5,2 (3,2 – 6,3)	0,093
IL-6	3,7 (3,4 – 4,8)	3,61 (2,9 – 5,4)	1,000	3,6 (3,37 – 3,9)	5,4 (5,3 – 5,8)	0,279
IL-10	4,3 (3,6 – 4,9)	4,8 (3,7 – 5,0)	0,345	4,3 (3,7 – 4,8)	5,1 (3,1 – 5,4)	0,062

Nota: Foram calculadas mediana (percentil 50) e percentis 25 e 75 para cada citocina nos quatro sítios avaliados. Os valores para cada citocina foram mensurados em pg/mL. As comparações entre grupos foram calculadas pelo teste do *Qui-quadrado*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. I-C = Líquido intracístico; IL- = Citocina; IFN- = Interferon; TNF = Fator de necrose tumoral; CEO = Câncer epitelial de ovário.

A análise das pacientes com CEO mostrou uma menor sobrevida global para aquelas com níveis de IL-6 no líquido ascítico ≥ 6 pg/ml ($p = 0,001$) e níveis de IL-6 no tumor ≥ 4 pg/ml ($p = 0,007$), (Fig. 4.2: A e B).

Pacientes com IL-10 $\geq 3,5$ pg/ml ($p=0,001$) no tumor e IL-10 ≥ 123 pg/ml ($p = 0,003$) no líquido ascítico apresentaram menor sobrevida global (Fig. 4.3: A e B).

A análise do perfil Th1 no líquido intracístico de pacientes com CEO, mostrou maior sobrevida em concentrações de IFN- $\gamma \geq 1,9$ pg/ml ($p = 0,003$). (Fig. 4.4)

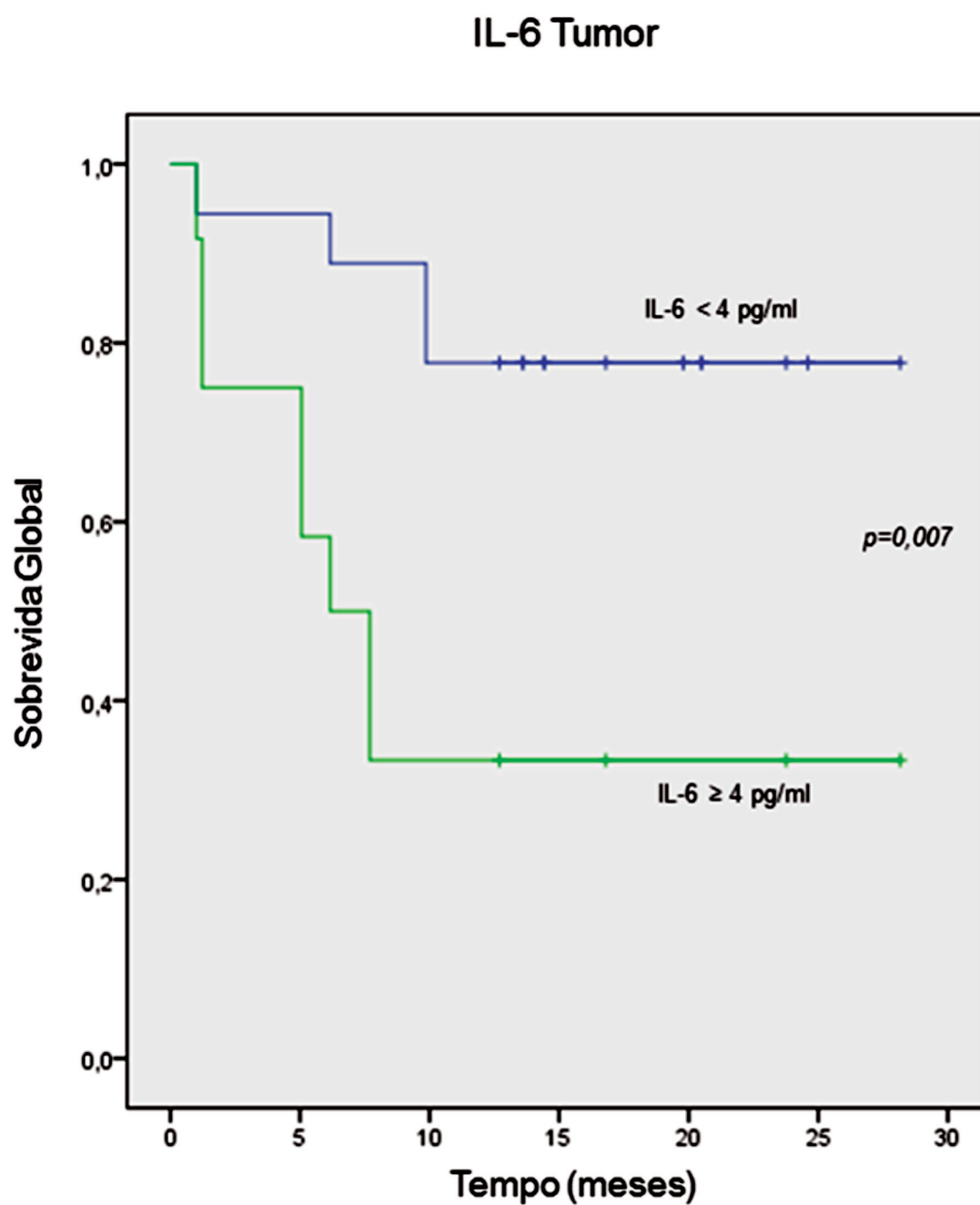


Figura 4.2-A. Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-6 no tumor.

Nota: Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida global por tempo de seguimento (meses). O ponto de corte para a concentração da citocina foi estabelecido pela mediana e mensurado em pg/mL. IL- = Citocina. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística utilizou o método de *Cox Regression*.

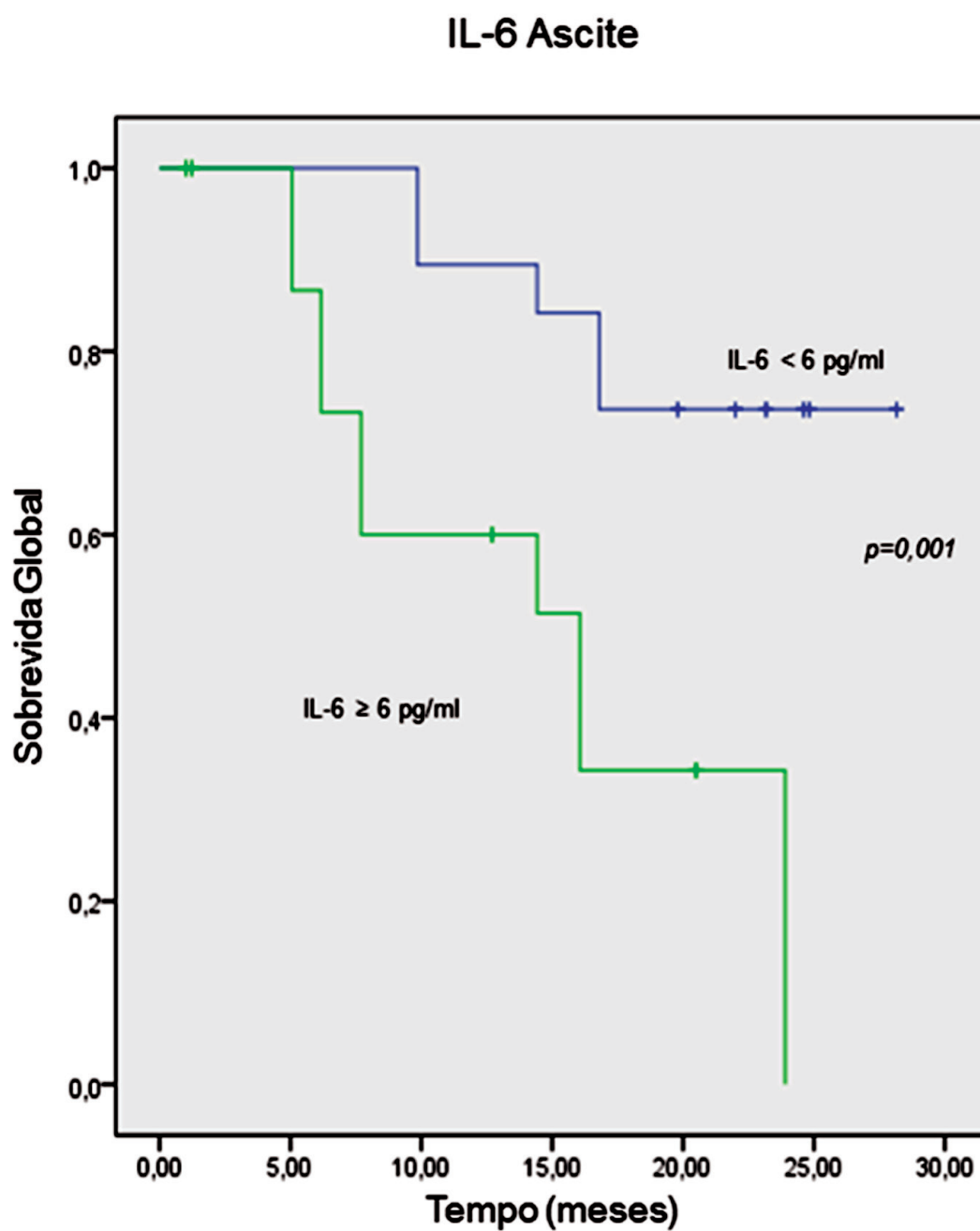


Figura 4.2-B: Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-6 no líquido ascítico.

Nota: Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida global por tempo de seguimento (meses). O ponto de corte para a concentração da Citocina foi estabelecido pela mediana e mensurado em pg/mL. IL- = Citocina. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística utilizou o método de *Cox Regression*.

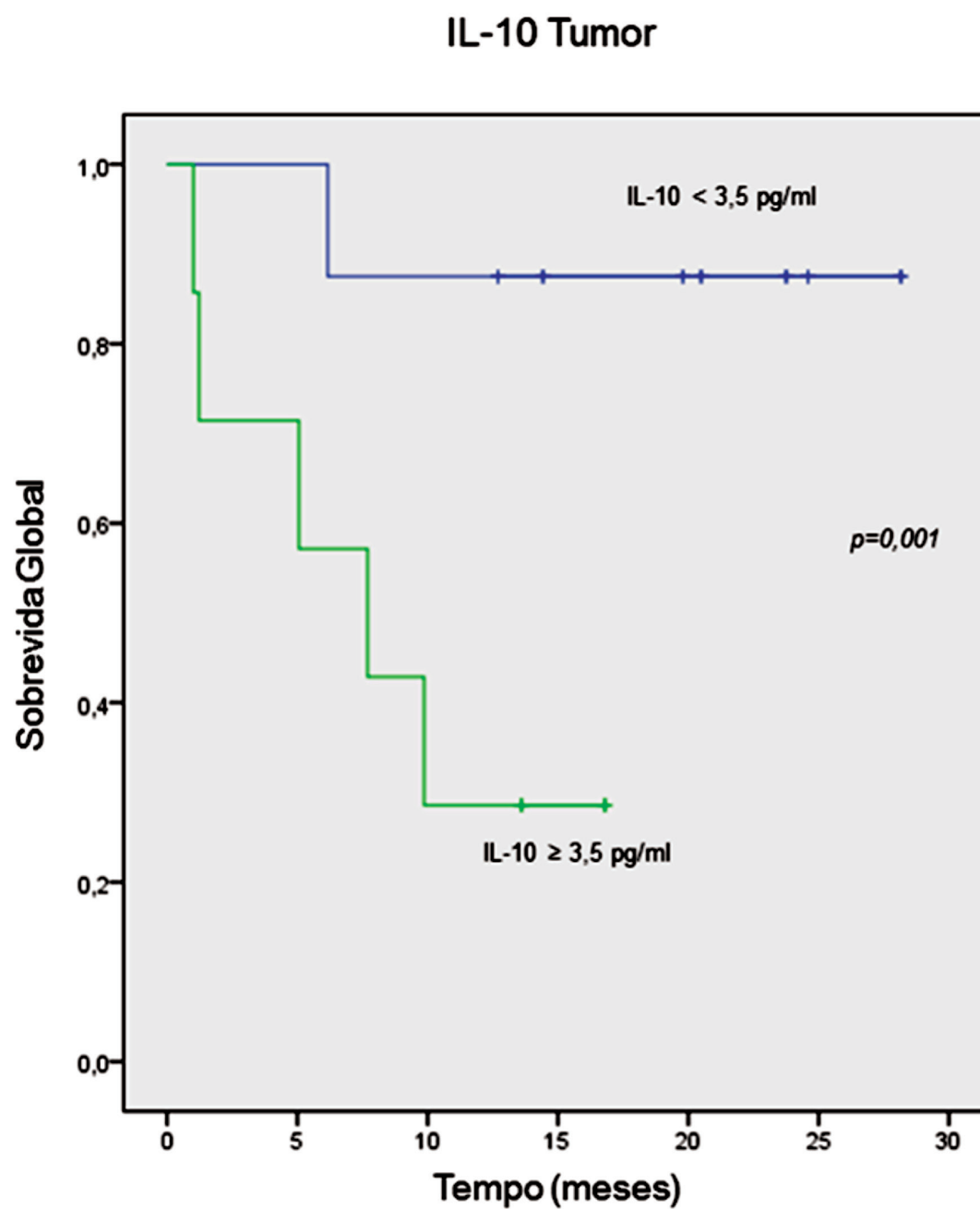


Figura 4.3-A. Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-10 no tumor.

Nota: Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida global por tempo de seguimento (meses). O ponto de corte para a concentração da citocina foi estabelecido pela mediana e mensurado em pg/mL. IL- = Citocina. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística utilizou o método de *Cox Regression*.

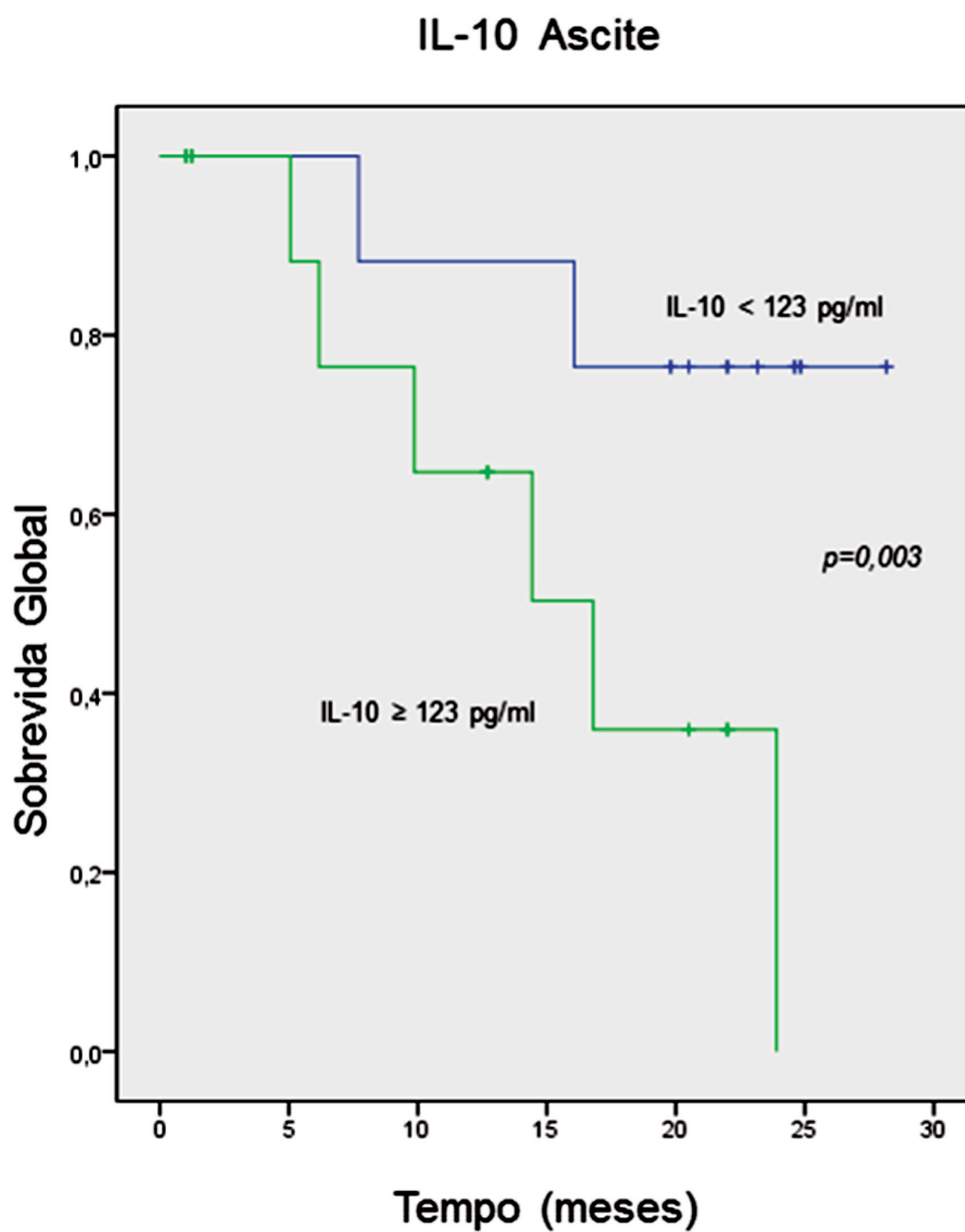


Figura 4.3-B. Análise da sobrevida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IL-10 no líquido ascítico.

Nota: Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida global por tempo de seguimento (meses). O ponto de corte para a concentração da citocina foi estabelecido pela mediana e mensurado em pg/mL. IL- = Citocina. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística utilizou o método de *Cox Regression*.

IFN- γ Intra-Cístico

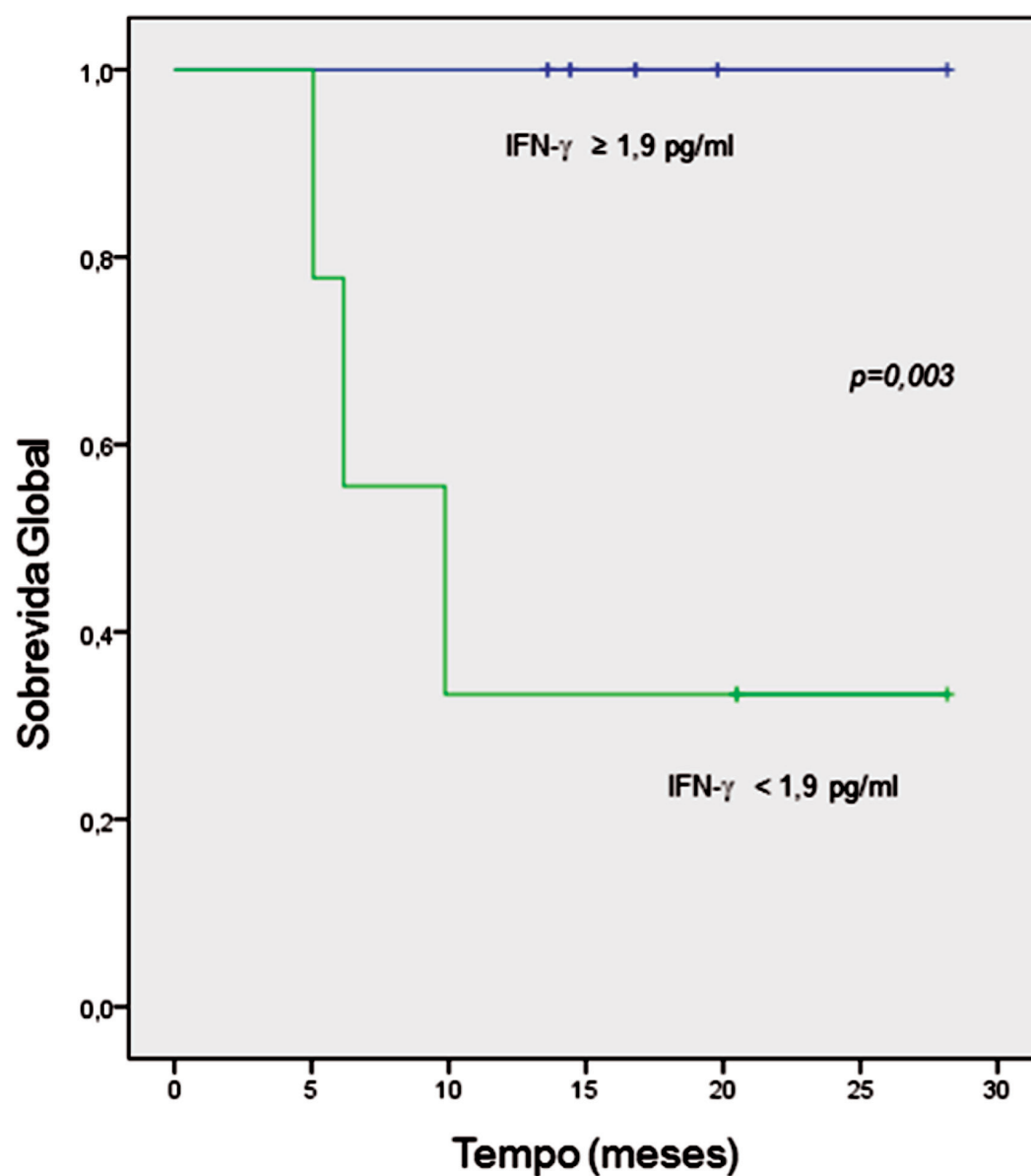


Figura 4.4. Análise da sobrevivida global das pacientes com câncer epitelial de ovário pelas concentrações da citocina IFN- γ no líquido intracístico.

Nota: Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivida global por tempo de seguimento (meses). O ponto de corte para a concentração da citocina foi estabelecido pela mediana e mensurado em pg/mL. IFN- = Interferon. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística utilizou o método de *Cox Regression*.

A Figura 4.5 sumariza, por representação esquemática, o balanço entre as citocinas com perfil Th1 e Th2 e evidencia que concentrações elevadas das citocinas TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 estavam associadas a fatores determinantes de mau prognóstico, com menor sobrevida global. As citocinas IFN- γ e IL-2 associaram a um perfil de bom comportamento biológico, mostrando maior sobrevida.

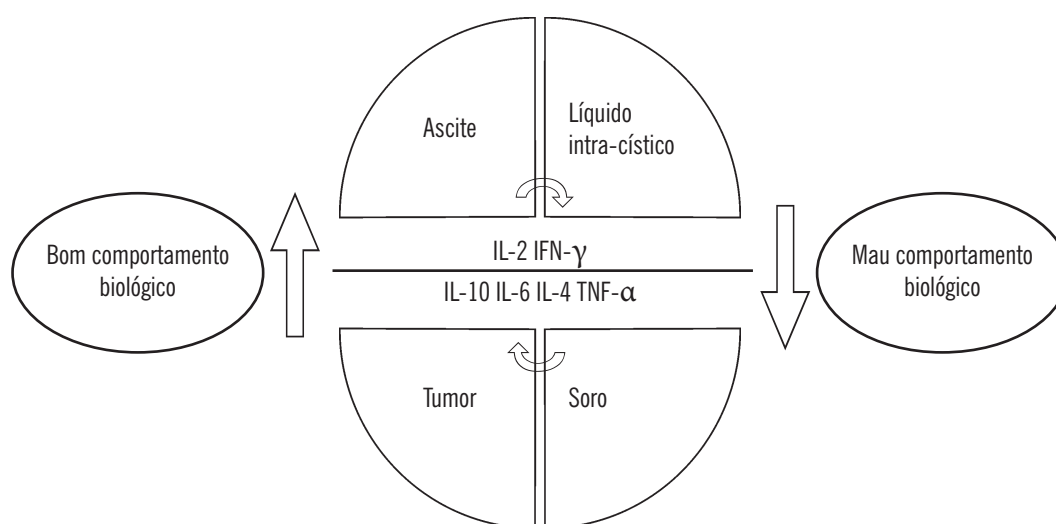


Figura 4.5. Representação esquemática da razão entre citocinas mostrando o perfil de resposta imune em pacientes com CEO, nos quatro diferentes sítios tumorais.

Nota: Pacientes com valores elevados das citocinas IL-2 e IFN- γ , associaram-se a fatores de melhor prognóstico e maior sobrevida. Pacientes com concentrações mais elevadas das citocinas IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α associaram-se a fatores com pior prognóstico e menor sobrevida. IL- = Citocina; IFN- = Interferon.

5 DISCUSSÃO

O câncer de ovário nas condições atuais justifica a busca por marcadores diagnósticos e prognósticos (Jemal, Siegel et al., 2009). A resposta imune, pela sua importância nos processos de carcinogênese, representa uma linha de pesquisa com grande potencial em oncologia (Schottenfeld and Beebe-Dimmer, 2006) e o presente estudo avaliou potenciais citocinas que permitissem sua utilização como marcadores no câncer de ovário. Essa escolha deveu-se ao fato de que determinado perfil de resposta imune, cujas diferenciação e multiplicação ocorrem pela produção de determinadas citocinas, é capaz de contribuir para indução da apoptose, controle e regressão do tumor, por meio da ativação de macrófagos, células dendríticas e mastócitos atraídos por células TCD4+ (Moser and Murphy, 2000).

Mecanismos de fuga poderiam ocorrer quando as células TCD4+ desviassem a qualidade da resposta para um padrão Th2, aumentando a produção de citocinas que facilitassem o aumento da angiogênese, a perda da apoptose ou mesmo a geração de um ambiente tumoral rico em citocinas pró-inflamatórias capazes de desviar a resposta imune para a produção de anticorpos pela ativação de linfócitos B que pouco atuariam na destruição do tumor (Moser and Murphy, 2000; Balkwill, Charles et al., 2005).

O presente estudo procurou avaliar o perfil da resposta imune em quatro prováveis ambientes em que se pudesse mensurar e comparar as citocinas extra-celulares e estabelecê-

las como marcadores. A análise das repercussões imunológicas locais e sistêmicas poderia contribuir para elucidação até mesmo dos resultados conflitantes, observados na literatura, sobre a associação das citocinas no CEO.

Apesar das citocinas com perfil Th1 terem sido detectadas nos quatro sítios avaliados (tumor, ascite, líquido intracístico e soro), em quase todas as pacientes, a característica de maior relevância foi a observação destes valores em baixa concentração, quando comparados à resposta Th2. Outros autores que avaliaram resposta imune no câncer de ovário evidenciaram citocinas imunossupressoras e pró-inflamatórias elevadas, que serviram como marcadores diagnósticos (Kavsak, Lee et al., 2008; Nowak, Glowacka et al.; Yigit, Figdor et al.).

Foram encontradas maiores concentrações das citocinas Th1 (IFN- γ) e IL-2, no grupo controle, tanto no ovário normal quanto no soro, quando comparadas às pacientes com CEO. Este achado, não evidente em estudo realizado por Nowak et al., que analisou o perfil de citocinas no soro e no ambiente tumoral, aponta para uma possível supressão da resposta Th1 nas pacientes com CEO (Nowak, Glowacka et al.).

Ainda no presente estudo, nas pacientes com CEO, observou-se para cada citocina, uma maior concentração na ascite e no líquido intracístico, comparadas ao tumor e soro. Estes achados sugerem uma resposta imune mais intensa nos locais de crescimento e disseminação tumoral, tornando as avaliações nestes meios mais fidedignas e menos vulneráveis às variações nas concentrações destas citocinas (Darai, Detchev et al., 2003; Nowak, Glowacka et al.).

No atual estudo, foram encontrados valores de TNF- α significativamente mais elevados em pacientes com câncer epitelial de ovário avançado quando comparados ao grupo controle ou às mulheres com CEO nos estágios I/II, no tumor, na ascite, e no soro.

Houve também uma associação desta citocina com citorredução insatisfatória e níveis séricos elevados do CA-125.

Embora considerado de caráter pró-inflamatório e um agente estimulador da resposta Th1, com desvio e ativação de macrófagos e células dendríticas capazes de aumentar a apoptose, o TNF- α apresenta efeitos adversos e atua como facilitador dos mecanismos de desenvolvimento tumoral. Muitos tumores, diferentemente dos tecidos normais, produzem pequenas quantidades de TNF- α e estudos com modelos experimentais demonstraram seu efeito potencializador no crescimento e propagação de algumas neoplasias como as de pele, ovário, pâncreas, cavidade pleural e intestino (Suganuma, Okabe et al., 1999; Kulbe, Thompson et al., 2007; Egberts, Cloosters et al., 2008).

Em um modelo utilizando cultura de células do CEO, foi evidenciada a importância do TNF- α expresso por uma rede de células malignas autônomas responsáveis pela produção de uma série de citocinas inflamatórias, como a IL-6, o fator inibidor de macrófagos (MIF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Kulbe, Thompson et al., 2007). Demonstrou-se que estas células atuaram no microambiente do câncer de ovário, afetando particularmente o infiltrado leucocitário e o desenvolvimento de vasos sanguíneos no tumor peritoneal. As ações angiogênicas do TNF- α podem ser devidas, pelo menos em parte, à sua capacidade de estimular a diferenciação das células mielóides precursoras em células endoteliais no microambiente tumoral (Balkwill 2009).

Em outro modelo experimental avaliando o câncer de pulmão, o TNF- α produzido pelas células malignas também causou aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos já existentes, estimulando derrame pleural com disseminação de células malignas (Stathopoulos, Kollintza et al. 2007).

No CEO, o TNF- α atua nas interações entre o tumor e o sistema imune facilitando

a invasão e progressão da neoplasia pela geração de um fenótipo de macrófagos tumor-associados apontados como fatores de mau prognóstico (Hagemann, Wilson et al., 2005; Hagemann, Wilson et al., 2006).

Citocinas pró-inflamatórias (IL-6), imunossupressoras (IL-10) e com perfil Th2 (IL-4 e IL-6) foram detectadas em mais de 90% das pacientes nos quatro sítios avaliados neste estudo. Não houve diferenças nas concentrações séricas de IL-4, IL-6 e IL-10, nas pacientes com CEO, quando comparadas ao grupo controle, porém, foram detectados níveis mais altos de IL-4, IL-6 e IL-10 no macerado tumoral. Também foi encontrada associação entre o perfil de resposta imune nas pacientes com câncer de ovário e o estadiamento. Mulheres nos estágios III/IV apresentaram dosagens mais elevadas da citocina IL-10 na ascite em relação àquelas nos estágios I/II. A dosagem das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 e sua associação com achados clínicos e laboratoriais mostrou nos estágios III/IV, concentrações significativamente maiores nos quatro ambientes estudados. Níveis séricos elevados do CA-125 apresentaram maiores concentrações de IL-10 no líquido intracístico. Pacientes com CEO e tumor indiferenciado tiveram níveis mais altos de IL-4, IL-6 e IL-10 no microambiente tumoral. Também houve uma associação entre as concentrações mais elevadas das citocinas IL-6 e IL-10 e a citorredução insatisfatória.

Citocinas imunossupressoras como a IL-10 são produzidas a partir de macrófagos tumor-associados e células malignas, que inibem a ativação das células de controle da apoptose (Poggi and Zocchi, 2006; Carr, Adair et al., 2008). A secreção dessas citocinas é parte de um dos mecanismos de fuga do tumor com o desvio da resposta imune para o perfil Th2, já que sua ativação ocorre principalmente pelas citocinas IL-4 e IL-10 (Balkwill, Charles et al., 2005). Esses macrófagos polarizados diferem na produção e função de citocinas, e na expressão de seus receptores. Em geral, a Th1 age por células efetoras

que destroem as células tumorais, enquanto o tipo 2 regula e promove a angiogênese na remodelação e reparação tecidual (Mantovani, Schioppa et al., 2003). Este ambiente rico em citocinas Th2 facilita a ruptura da membrana basal e o processo de disseminação local e à distância (Freedman, Deavers et al., 2004; Kim, Emi et al., 2005).

As células malignas produtoras de IL-6 e IL-10 inibem o processo inflamatório adequado e o contato entre as respostas imunes inata e adaptativa em vários cânceres humanos, favorecendo o crescimento do tumor (Freedman, Deavers et al., 2004; Zitvogel, Tesniere et al., 2006).

No presente estudo, também foi demonstrado outro aspecto negativo em relação ao perfil de resposta Th1, quando identificadas concentrações significativamente mais baixas da citocina IFN- γ no tumor. Também foram evidenciados níveis mais altos dessa citocina na ascite e líquido intracístico das pacientes nos estágios I/II em comparação com os estágios III/V, mesmo sem haver significância estatística. Foi demonstrado que pacientes com câncer de ovário com maiores níveis de IFN- γ no líquido intracístico tiveram maior sobrevida global.

Pesquisas têm procurado estabelecer o papel das citocinas na terapia do câncer. Sabe-se que o IFN- γ pode aumentar a resposta antitumoral sendo considerado um agente promissor, com eficácia comprovada na terapia do melanoma e de alguns tumores renais (Balkwill, Charles et al., 2005; Gavalas, Karadimou et al., 2010). Sua utilização em combinação com a carboplatina, em um ensaio clínico de fase II, mostrou boa resposta contra o câncer de ovário recorrente, platina-sensível (Schmeler, Vadhan-Raj et al., 2009). Estudos randomizados avaliaram o papel do IFN- γ como terapia de primeira linha ou como estratégia de manutenção no controle do crescimento neoplásico pelo aumento da resposta imune contra antígenos tumorais, especialmente com vacinas que utilizem

células MAK (Macrófago-Ativado Killer) (Windbichler, Hausmaninger et al., 2000; Wagner, Kohler et al., 2001; Ribas, Butterfield et al., 2003).

O IFN- γ também é capaz de reverter as propriedades imunossupressoras dos macrófagos por aumentar, potencialmente, a eficácia da imunoterapia antitumoral com o estímulo na produção de células T efectoras (Schuurhuis, van Montfoort et al., 2006).

Também foi observada uma associação entre níveis mais altos de IL-6 e IL-10 no tumor e na ascite e uma menor sobrevida global.

A citocina IL-6 no soro de pacientes com CEO está associada a menores taxas de sobrevida livre de doença (Scambia, Testa et al., 1995; Tempfer, Zeisler et al., 1997). Produzida no ambiente tumoral pelas células mesoteliais peritoneais, células tumorais e leucócitos tumor-associados, a IL-6 avaliada na ascite e no líquido intracístico aparenta ser mais relevante que sua dosagem sérica, pela sua meia vida curta e rápida eliminação na circulação (Offner, Obrist et al., 1995; Giuntoli, Webb et al., 2009).

O acúmulo da IL-6 no ambiente tumoral parece estar relacionado à aquisição de mecanismos de quimiorresistência a drogas como o Taxol, levando à recidiva precoce e menores taxas de sobrevida (Duan, Feller et al., 1999; Duan, Foster et al., 2006; Lane, Matte et al.). Esta citocina também está diretamente ligada à estimulação da angiogênese no câncer de ovário e o bloqueio de sua cascata de sinalização, induzido por drogas quimioterápicas, permite a apoptose de células endoteliais e regressão tumoral em modelos experimentais (Obata, Tamakoshi et al., 1997; Burges and Schmalfeldt, 2011).

Outros mecanismos de combate à imortalização das células tumorais, como o bloqueio do desvio da resposta Th1 para Th2, também parecem melhorar a resposta antitumoral com a supressão da via sinalizadora da IL-6 (Schauer, Sood et al., 2011; Yigit, Figdor et al., 2011). Porém, um estudo avaliando a tentativa de bloqueio da via

sinalizadora da IL-6 com a utilização de anticorpos monoclonais não se mostrou eficaz no aumento da sensibilidade do tumor às drogas paclitaxel e siltuximab no CEO, o que demonstra a complexa rede de interações entre as citocinas e os mecanismos de escape do tumor (Guo, Nemeth et al., 2010).

A citocina IL-10 é conhecida por desempenhar um papel na queda da expressão das citocinas Th1, aumentar a imunossupressão das células MHC classe I e classe II e diminuir a produção de moléculas coestimulatórias, como a proteína CD-40 das células dendríticas no microambiente tumoral, suprimindo a maturação e o funcionamento destas células (Lucey, Clerici et al., 1996; Yue, Dummer et al., 1997; Cottrez and Groux, 2001; Shurin, Yurkovetsky et al., 2002). Um estudo utilizando camundongos transgênicos com superexpressão da IL-10 mostrou rápida progressão tumoral (Hagenbaugh, Sharma et al., 1997). Outro estudo envolveu o uso de vacinas para o tratamento de pacientes com melanoma em estágio avançado e mostrou que a melhora na sobrevida das pacientes tratadas ocorreu apenas nos tumores com baixa produção de IL-10, sugerindo a contribuição imunossupressora desta citocina para imortalização tumoral e queda da eficácia da vacina (Mahipal, Terai et al.). Estes dados sugerem que o efeito da vacina autóloga, em pacientes com melanoma avançado, pode ser melhorado através da adição de um antagonista da IL-10 (Mahipal, Terai et al.).

Terai *et al* mostraram que imunoadesinas desenvolvidas como antagonistas da IL-10 são capazes de bloquearem a atividade biológica desta citocina ao se ligarem ao domínio extracelular dos receptores de IL-10 produzidos pelas células de melanoma, facilitando a indução da resposta imunológica antitumoral após a vacina contra o câncer (Terai, Tamura et al., 2009).

O presente estudo identificou o desvio da resposta imune Th1 para Th2 nos sítios

avaliados, quando comparados casos e controles, ou mesmo quando os casos foram estratificados em estágios iniciais e avançados, constatando-se que, quanto mais avançado o tumor, mais evidente a resposta Th2. Houve também uma associação significativa entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α) e imunossupressoras (IL-10) e outros fatores diretamente relacionados com mau prognóstico no câncer de ovário, como grau de diferenciação tumoral, citorredução à cirurgia primária, estadiamento e níveis séricos do CA-125 mais elevados. Finalmente, também foi evidenciado que níveis mais elevados das citocinas IL-6 e IL-10 no macerado tumoral e na ascite e mais baixos do IFN- γ no líquido intracístico, associaram-se à menor sobrevida global nas pacientes com câncer epitelial de ovário.

Propõe-se pelos achados neste estudo, um modelo inflamatório em que se observa uma exacerbação da resposta imune com o predomínio e ativação da citocina IL-4, propiciando a maturação de células T CD4 virgens para células Th2. Com a replicação destas células, observa-se então, a produção e o aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α , e anti-inflamatórias como a IL-10, também secretadas por células tumorais, que provocam a supressão de citocinas como o IFN- γ e desviam a resposta a celular adequada com inibição do processo de fagocitose para a produção de anticorpos inertes ao combate tumoral, além de estimular o processo de tumorigênese pela ativação da angiogênese através da IL-6 e do TNF- α , suprimir a maturação de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas e alterar o processo de reconhecimento dos antígenos tumorais pelo complexo principal de histocompatibilidade, como ocorre em ambientes ricos em IL-10. Tem-se então, um perfil de resposta imune que proporciona fuga da apoptose e facilita a progressão tumoral.

Neste estudo, apontam-se como características positivas, a abrangência de um

grupo de citocinas responsáveis pela sinalização da resposta imune celular e humoral via linfócitos T CD4+ dosadas em quatro diferentes sítios que envolvem o ambiente tumoral e a resposta sistêmica. Também, a avaliação por meio de uma metodologia confiável e de simples execução, gera um processo de fácil reprodutibilidade pela dosagem das amostras em uma mesma bateria e com custo/benefício que possibilite o seu uso rotineiro. Não se encontrou na literatura, dados nacionais que identificassem o perfil populacional de citocinas para estabelecer um paralelo entre os dados encontrados no estudo e o perfil geral da população, fato parcialmente solucionado com a dosagem do grupo controle. Os estudos encontrados na literatura mundial também evidenciaram dificuldades na obtenção de casuística e na comparação entre grupos.

Esse estudo também permitiu comparação entre as pacientes com CEO e o grupo controle avaliando-se a associação entre as concentrações das citocinas, os fatores prognósticos, a recorrência e a sobrevida em período de seguimento suficiente para se obter diferenças estatisticamente significativas e estabelecer algumas delas como marcadores prognósticos. As dificuldades e limitações do estudo ocorreram principalmente na obtenção dos casos e no estabelecimento do cálculo amostral, por se tratar de uma patologia com baixa prevalência, alta letalidade e pela ausência de marcadores diagnósticos confiáveis. Dúvidas surgiram na criação dos parâmetros adequados para um grupo controle, por questões éticas e pela gama de neoplasias benignas que de fato não corresponderiam a uma resposta ovariana compatível com a normalidade. O grupo controle foi composto de mulheres na pós-menopausa, submetidas à exérese anexial de acordo com a avaliação do cirurgião no momento da operação e sob consentimento expresso da paciente, tornando a criação deste grupo tão ou mais difícil que a obtenção das amostras de CEO. A ausência de um controle com ascite e líquido intracístico dificultou a comparação das citocinas

nestes sítios, fato parcialmente contornado pela estratificação das pacientes com CEO em estágios I/II e III/IV.

As constantes buscas por mecanismos causadores quimiorresistência e pelo desenvolvimento de vacinas para o tratamento do câncer têm como principal objetivo induzir ou estimular a resposta imune mediada por células contra antígenos tumorais específicos. No entanto, há grande discrepância entre o desenvolvimento da imunidade adaptativa contra esses antígenos e a evolução clínica das pacientes tratadas com quimioterapia ou por vacinas. Este fato também encontra explicação nas mais variadas formas de interação entre as células tumorais e o sistema imunológico do hospedeiro no ambiente tumoral. Os dados apresentados no atual estudo sugerem que a presença de citocinas como a IL-6 e IL-10 contribuem para um pior prognóstico entre as pacientes com tumor epitelial de ovário nos estágios avançados e que níveis mais elevados do IFN- γ no ambiente tumoral associam-se com maiores taxas de sobrevida. Por estes achados especula-se que novos estudos, com modelos experimentais e posteriormente em humanos, associando supressão de IL-6 e IL-10 e superexpressão do IFN- γ no microambiente tumoral talvez contribua para melhores resultados no tratamento de mulheres com CEO, coibindo a imortalização tumoral por quimiorresistência ou mesmo potencializando o efeito terapêutico de futuras vacinas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que:

- Mulheres com CEO apresentam predominantemente uma resposta imune Th2 e um padrão de imunossupressão.
- Pacientes com CEO têm um predomínio de concentrações mais elevadas das citocinas, no líquido intracístico e na ascite, comparadas ao tumor e soro.
- Fatores prognósticos relacionados com a progressão tumoral em pacientes com CEO associaram-se a um perfil de citocinas Th2 e imunossupressor.
- Citocinas Th2 e imunossupressoras em elevadas concentrações e citocinas Th1 em baixas concentrações associaram-se a uma menor sobrevida nas pacientes com CEO.

7 REFERÊNCIAS

(INCA), I. N. d. C. (2009). Câncer, INCA.

ACS (2011). “SOCIETY, A.C., Cancer Facts & Figures 2011“. American Cancer Society: 1-70.

Baan, R., K. Straif, et al. (2006). “Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc”. *Lancet Oncol* 7(4): 295-6.

Balkwill, F. (2006). “TNF-alpha in promotion and progression of cancer”. *Cancer Metastasis Rev* 25(3): 409-16.

Balkwill, F. (2009). “Tumour necrosis factor and cancer”. *Nat Rev Cancer* 9(5): 361-71.

Balkwill, F., K. A. Charles, et al. (2005). “Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease“. *Cancer Cell* 7(3): 211-7.

Benedet, J. L., H. Bender, et al. (2000). “FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology“. *Int J Gynaecol Obstet* 70(2): 209-62.

Bonello, N., K. McKie, et al. (1996). “Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat”. *Biol Reprod* 54(2): 436-45.

Bouvier, M. (2003). “Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective”. *Mol Immunol* 39(12): 697-706.

- Brewer, M. A., K. Johnson, et al. (2003). "Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia". *Clin Cancer Res* 9(1): 20-30.
- Burges, A. and B. Schmalfeldt (2011). "Ovarian cancer: diagnosis and treatment". *Dtsch Arztebl Int* 108(38): 635-41.
- Burke, F., P. D. Smith, et al. (1999). "Cytotoxic response of ovarian cancer cell lines to IFN-gamma is associated with sustained induction of IRF-1 and p21 mRNA". *Br J Cancer* 80(8): 1236-44.
- Carr, T. M., S. J. Adair, et al. (2008). "Immunological profiling of a panel of human ovarian cancer cell lines". *Cancer Immunol Immunother* 57(1): 31-42.
- Carson, R. T. and D. A. Vignali (1999). "Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay". *J Immunol Methods* 227(1-2): 41-52.
- Constant, S. L. and K. Bottomly (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches". *Annu Rev Immunol* 15: 297-322.
- Corinti, S., C. Albanesi, et al. (2001). "Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions". *J Immunol* 166(7): 4312-8.
- Cottrez, F. and H. Groux (2001). "Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10". *J Immunol* 167(2): 773-8.
- Darai, E., R. Detchev, et al. (2003). "Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours". *Hum Reprod* 18(8): 1681-5.
- Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy". *Nat Rev Cancer* 4(1): 11-22.

- Duan, Z., A. J. Feller, et al. (1999). "Discovery of differentially expressed genes associated with paclitaxel resistance using cDNA array technology: analysis of interleukin (IL) 6, IL-8, and monocyte chemotactic protein 1 in the paclitaxel-resistant phenotype". *Clin Cancer Res* 5(11): 3445-53.
- Duan, Z., R. Foster, et al. (2006). "Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer". *Clin Cancer Res* 12(17): 5055-63.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting". *Immunity* 21(2): 137-48.
- Egberts, J. H., V. Cloosters, et al. (2008). "Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis". *Cancer Res* 68(5): 1443-50.
- Espey, L. L. (1992). "A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation". *Acta Endocrinol (Copenh)* 126 Suppl 2: 1-31.
- Espey, L. L. (1994). "Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction". *Biol Reprod* 50(2): 233-8.
- Freedman, R. S., M. Deavers, et al. (2004). "Peritoneal inflammation – A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC)". *J Transl Med* 2(1): 23.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, et al. (1996). "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides". *Science* 272(5264): 1001-4.
- Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects". *Nat Rev Immunol* 4(12): 941-52.
- Galatiuc, C., M. Gherman, et al. (1995). "Natural killer (NK) activity in human responders and nonresponders to stimulation by anti-CD16 antibodies". *Cell Immunol* 163(2): 167-77.

Gavalas, N. G., A. Karadimou, et al. (2010). “Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization”. *Clin Dev Immunol* 2010: 791603.

Giuntoli, R. L., 2nd, T. J. Webb, et al. (2009). “Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity”. *Anticancer Res* 29(8): 2875-84.

Guo, Y., J. Nemeth, et al. (2010). “Effects of siltuximab on the IL-6-induced signaling pathway in ovarian cancer”. *Clin Cancer Res* 16(23): 5759-69.

Hagemann, T., J. Wilson, et al. (2006). “Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype”. *J Immunol* 176(8): 5023-32.

Hagemann, T., J. Wilson, et al. (2005). “Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK”. *J Immunol* 175(2): 1197-205.

Hagenbaugh, A., S. Sharma, et al. (1997). “Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice”. *J Exp Med* 185(12): 2101-10.

Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). “The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games”. *Immunology* 115(1): 1-20.

Jackaman, C., C. S. Bundell, et al. (2003). “IL-2 intratumoral immunotherapy enhances CD8+ T cells that mediate destruction of tumor cells and tumor-associated vasculature: a novel mechanism for IL-2”. *J Immunol* 171(10): 5051-63.

Jackaman, C. and D. J. Nelson (2011). “Intratumoral interleukin-2/agonist CD40 antibody drives CD4(+)-independent resolution of treated-tumors and CD4 (+)-dependent systemic and memory responses”. *Cancer Immunol Immunother.*

Jemal, A., R. Siegel, et al. (2009). "Cancer statistics, 2009". *CA Cancer J Clin* 59(4): 225-49.

Kandalaft, L. E., D. J. Powell, Jr., et al. (2011). "Immunotherapy for ovarian cancer: what's next?" *J Clin Oncol* 29(7): 925-33.

Kavsak, P. A., A. Lee, et al. (2008). "Cytokine elevations in acute coronary syndrome and ovarian cancer: a mechanism for the up-regulation of the acute phase proteins in these different disease etiologies". *Clin Biochem* 41(7-8): 607-10.

Kawakami, K., M. Kawakami, et al. (2001). "Overexpressed cell surface interleukin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxin therapy". *Crit Rev Immunol* 21(1-3): 299-310.

Kim, R., M. Emi, et al. (2005). "Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses". *Cancer Biol Ther* 4(9): 924-33.

Kioi, M., S. Takahashi, et al. (2005). "Expression and targeting of interleukin-4 receptor for primary and advanced ovarian cancer therapy". *Cancer Res* 65(18): 8388-96.

Kryczek, I., M. Banerjee, et al. (2009). "Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments". *Blood* 114(6): 1141-9.

Kryczek, I., S. Wei, et al. (2007). "Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment". *J Immunol* 178(11): 6730-3.

Kulbe, H., R. Thompson, et al. (2007). "The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells". *Cancer Res* 67(2): 585-92.

Lane, D., I. Matte, et al. (2011). “Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients”. *BMC Cancer* 11: 210.

Lo, C. W., M. W. Chen, et al. (2011). “IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer”. *Cancer Res* 71(2): 424-34.

Lucey, D. R., M. Clerici, et al. (1996). “Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases”. *Clin Microbiol Rev* 9(4): 532-62.

Lund-Johansen, F., K. Davis, et al. (2000). “Flow cytometric analysis of immunoprecipitates: high-throughput analysis of protein phosphorylation and protein-protein interactions”. *Cytometry* 39(4): 250-9.

Mahipal, A., M. Terai, et al. (2011). “Tumor-derived interleukin-10 as a prognostic factor in stage III patients undergoing adjuvant treatment with an autologous melanoma cell vaccine”. *Cancer Immunol Immunother* 60(7): 1039-45.

Maisey, K., G. Nardocci, et al. (2003). “Expression of proinflammatory cytokines and receptors by human fallopian tubes in organ culture following challenge with *Neisseria gonorrhoeae*”. *Infect Immun* 71(1): 527-32.

Mantovani, A., T. Schioppa, et al. (2003). “Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations”. *Tumori* 89(5): 459-68.

Marth, C., E. Muller-Holzner, et al. (1990). “Gamma-interferon reduces expression of the protooncogene c-erbB-2 in human ovarian carcinoma cells”. *Cancer Res* 50(21): 7037-41.

Matzinger, P. (2002). “The danger model: a renewed sense of self”. *Science* 296(5566): 301-5.

- McGee, Z. A., R. L. Jensen, et al. (1999). "Gonococcal infection of human fallopian tube mucosa in organ culture: relationship of mucosal tissue TNF-alpha concentration to sloughing of ciliated cells". *Sex Transm Dis* 26(3): 160-5.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2000). "How does the immune system distinguish self from nonself?" *Semin Immunol* 12(3): 185-8; discussion 257-344.
- Meng, R. D. and W. S. El-Deiry (2001). "p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma". *Exp Cell Res* 262(2): 154-69.
- Minami, Y., T. Kono, et al. (1993). "The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes". *Annu Rev Immunol* 11: 245-68.
- Monti, P., B. E. Leone, et al. (2004). "Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell". *J Immunol* 172(12): 7341-9.
- Morgan, E., R. Varro, et al. (2004). "Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology". *Clin Immunol* 110(3): 252-66.
- Moser, M. and K. M. Murphy (2000). "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development". *Nat Immunol* 1(3): 199-205.
- Murdoch, W. J. (1996). "Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis". *Biol Rev Camb Philos Soc* 71(4): 529-43.
- Naora, H. and D. J. Montell (2005). "Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms". *Nat Rev Cancer* 5(5): 355-66.
- Nelms, K., A. D. Keegan, et al. (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions". *Annu Rev Immunol* 17: 701-38.

Ness, R. B. and C. Cottreau (1999). "Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer". *J Natl Cancer Inst* 91(17): 1459-67.

Nilsson, M. B., R. R. Langley, et al. (2005). "Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine". *Cancer Res* 65(23): 10794-800.

Nowak, M., E. Glowacka, et al. (2010). "Proinflammatory and immunosuppressive serum, ascites and cyst fluid cytokines in patients with early and advanced ovarian cancer and benign ovarian tumors". *Neuro Endocrinol Lett* 31(3): 375-83.

Obata, N. H., K. Tamakoshi, et al. (1997). "Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma". *Anticancer Res* 17(1A): 337-42.

Offner, F. A., P. Obrist, et al. (1995). "IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells". *Cytokine* 7(6): 542-7.

Okamoto, M., C. Lee, et al. (1997). "Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro". *Cancer Res* 57(1): 141-6.

Olson, J. E., J. R. Cerhan, et al. (2002). "Postmenopausal cancer risk after self-reported endometriosis diagnosis in the Iowa Women's Health Study". *Cancer* 94(5): 1612-8.

Orvieto, R., N. Fisch, et al. (2005). "Ovarian androgens but not estrogens correlate with the degree of systemic inflammation observed during controlled ovarian hyperstimulation". *Gynecol Endocrinol* 21(3): 170-3.

Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation". *Immunity* 28(4): 454-67.

Partridge, E., A. R. Kreimer, et al. (2009). "Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial". *Obstet Gynecol* 113(4): 775-82.

- Pei, R., J. Lee, et al. (1999). "Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads". *Hum Immunol* 60(12): 1293-302.
- Pierangeli, S. S., L. K. Silva, et al. (1999). "A flow cytometric assay for the detection of antiphospholipid antibodies". *Am Clin Lab* 18(6): 18-9.
- Poggi, A. and M. R. Zocchi (2006). "Mechanisms of tumor escape: role of tumor micro-environment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells". *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54(5): 323-33.
- Raspollini, M. R., F. Castiglione, et al. (2005). "Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma". *Ann Oncol* 16(4): 590-6.
- Ribas, A., L. H. Butterfield, et al. (2003). "Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy". *J Clin Oncol* 21(12): 2415-32.
- Ries, L. A., P. A. Wingo, et al. (2000). "The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer". *Cancer* 88(10): 2398-424.
- Roett, M. A. and P. Evans (2009). "Ovarian cancer: an overview". *Am Fam Physician* 80(6): 609-16.
- Rustin, G. J., P. Timmers, et al. (2006). "Comparison of CA-125 and standard definitions of progression of ovarian cancer in the intergroup trial of cisplatin and paclitaxel versus cisplatin and cyclophosphamide". *J Clin Oncol* 24(1): 45-51.
- Scambia, G., U. Testa, et al. (1995). "Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer". *Br J Cancer* 71(2): 354-6.

Schauer, I. G., A. K. Sood, et al. (2011). “Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer”. *Neoplasia* 13(5): 393-405.

Schmeler, K. M., S. Vadhan-Raj, et al. (2009). “A phase II study of GM-CSF and rIFN- γ plus carboplatin for the treatment of recurrent, platinum-sensitive ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer”. *Gynecol Oncol* 113(2): 210-5.

Schottenfeld, D. and J. Beebe-Dimmer (2006). “Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia”. *CA Cancer J Clin* 56(2): 69-83.

Schuurhuis, D. H., N. van Montfoort, et al. (2006). “Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine”. *J Immunol* 176(8): 4573-80.

Sers, C., K. Husmann, et al. (2002). “The class II tumour suppressor gene H-REV107-1 is a target of interferon-regulatory factor-1 and is involved in IFN γ -induced cell death in human ovarian carcinoma cells”. *Oncogene* 21(18): 2829-39.

Shan, W. and J. Liu (2009). “Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer”. *Cell Cycle* 8(19): 3107-11.

Shurin, M. R., Z. R. Yurkovetsky, et al. (2002). “Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10”. *Int J Cancer* 101(1): 61-8.

Silva-Filho, A. L. d. C., Eduardo Batista; Noviello, Maurício Bechara; Santos-Filho, Admário Silva; Traiman, Paulo; Triginelli, Sérgio Augusto; Cunha-Melo, José Renan. (2004). “Nongynecologic surgery in patients with ovarian cancer “ *Rev. bras. ginecol. obstet. (RBGO)* 26 (5): 411-416.

Stathopoulos, G. T., A. Kollintza, et al. (2007). “Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion”. *Cancer Res* 67(20): 9825-34.

Strandell, A., J. Thorburn, et al. (2004). “The presence of cytokines and growth factors in hydrosalpingeal fluid”. *J Assist Reprod Genet* 21(7): 241-7.

Suganuma, M., S. Okabe, et al. (1999). “Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice”. *Cancer Res* 59(18): 4516-8.

Svanborg, C., G. Godaly, et al. (1999). “Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence”. *Curr Opin Microbiol* 2(1): 99-105.

Taniguchi, T. and Y. Minami (1993). “The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview”. *Cell* 73(1): 5-8.

Tempfer, C., H. Zeisler, et al. (1997). “Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients”. *Gynecol Oncol* 66(1): 27-30.

Terai, M., Y. Tamura, et al. (2009). “Human interleukin 10 receptor 1/IgG1-Fc fusion proteins: immunoadhesins for human IL-10 with therapeutic potential”. *Cancer Immunol Immunother* 58(8): 1307-17.

Torres, M. P., M. P. Ponnusamy, et al. (2009). “Immunopathogenesis of ovarian cancer”. *Minerva Med* 100(5): 385-400.

Villadangos, J. A. (2001). “Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them”. *Mol Immunol* 38(5): 329-46.

Voelkl, S., T. V. Moore, et al. (2009). “Characterization of MHC class-I restricted TCRalpha-beta+ CD4- CD8- double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination”. *Cancer Immunol Immunother* 58(5): 709-18.

Wagner, U., S. Kohler, et al. (2001). “Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125: immune responses and survival in palliative treatment. See The biology behind: K. A. Foon and M. Bhattacharya-Chatterjee, Are solid tumor anti-idiotypic vaccines ready for prime time? Clin. Cancer Res., 7:1112-1115, 2001”. Clin Cancer Res 7(5): 1154-62.

Williams, A., C. A. Peh, et al. (2002). “The cell biology of MHC class I antigen presentation”. Tissue Antigens 59(1): 3-17.

Windbichler, G. H., H. Hausmaninger, et al. (2000). “Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial”. Br J Cancer 82(6): 1138-44.

Wu, A. H., C. L. Pearce, et al. (2009). “Markers of inflammation and risk of ovarian cancer in Los Angeles County”. Int J Cancer 124(6): 1409-15.

Yigit, R., C. G. Figdor, et al. (2011). “Cytokine analysis as a tool to understand tumour-host interaction in ovarian cancer”. Eur J Cancer 47(12): 1883-9.

Yue, F. Y., R. Dummer, et al. (1997). “Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules”. Int J Cancer 71(4): 630-7.

Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, et al. (2003). “Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer”. N Engl J Med 348(3): 203-13.

Zisman, A., A. J. Pantuck, et al. (2000). “Immune and genetic therapies for advanced renal cell carcinoma”. Rev Urol 2(1): 54-60.

Zitvogel, L., A. Tesniere, et al. (2006). “Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion”. Nat Rev Immunol 6(10): 715-27.

8 ANEXOS

ANEXO I

ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO (FIGO)

Estágio I	Tumor limitado aos ovários
	la Limitado a um ovário; ausência de ascite; cápsula intacta; ausência de tumor na superfície externa ovariana
	lb Comprometimento ovariano bilateral; ausência de ascite; cápsula intacta; ausência de tumor na superfície externa ovariana.
	lc* Comprometimento ovariano uni ou bilateral acompanhado de um ou mais dos fatores: tumor na superfície ovariana, cápsula rota, ascite ou lavado peritoneal positivo
Estágio II	Extensão pélvica da doença
	Ila Envolvimento de útero e ou trompas
	Ilb Envolvimento de outros tecidos pélvicos
	Ilc* IIA ou IIB associado a fator descrito em IC
Estágio III	Presença de implantes peritoneais fora da pelve e ou comprometimento de linfonodos retro-peritoneais. Inclui o comprometimento da superfície hepática, intestino delgado e omento.
	IIIa Grosseiramente limitada à pelve verdadeira; linfonodos negativos; comprometimento microscópico do peritônio.
	IIIb Implantes macroscópicos no peritônio, nenhum com diâmetro superior a dois centímetros; linfonodos negativos.
	IIIc Implantes peritoneais com diâmetro superior a dois centímetros e/ou comprometimento de linfonodos retro-peritoneais ou inguinais
Estágio IV	Metástases à distância; Inclui o comprometimento parenquimatoso do fígado e derrame pleural com citologia positiva.

ANEXO II

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 326/08

Interessado(a): Prof. Agnaldo Lopes Silva Filho
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 17 de setembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da resposta imune em pacientes com câncer ginecológico**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Tereza Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO III**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO E OVÁRIO****IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE:**

Nome: _____ Registro: _____

Idade: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Carteira de identidade: _____

A senhora está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa que visa investigar a presença de algumas substâncias no sangue, no útero e no ovário que possam nos ajudar a fazer o diagnóstico precoce das doenças desse órgão.

A participação no estudo consiste em doar um fragmento da peça cirúrgica (útero ou ovário) e ou uma amostra de sangue para serem analisados. Essa participação não modifica o tratamento proposto para a sua doença ou qualquer procedimento diagnóstico e de acompanhamento de rotina que esteja fazendo.

A sua identidade será preservada e o seu direito de não participar no estudo não a prejudicará no seu tratamento.

1. **DESCRIÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DOS MÉTODOS:** não haverá aumento do risco de complicações devido à retirada do fragmento do útero ou ovário. As complicações serão as mesmas da cirurgia realizada para o tratamento de sua doença.
2. **DESCRIÇÃO DA ANESTESIA:** poderá haver necessidade de me submeter à anestesia para a realização da cirurgia proposta. O tipo de anestesia vai depender do procedimento realizado, podendo ser bloqueio (anestesia peridural ou raque) ou geral.

3. DESTINO DA PEÇA OPERATÓRIA E SANGUE COLETADO: a peça cirúrgica será encaminhada à Anatomia Patológica para ser examinada. A amostra de sangue coletada será encaminhada para análise das substâncias associadas a inflamação possivelmente causada pelas doenças relacionadas neste estudo.
4. Recebi todas as informações que desejava conhecer e a possibilidade de fazer perguntas e questionar dúvidas.
5. Também entendi que, a qualquer momento e sem necessidade de dar nenhuma explicação poderei suspender o consentimento que agora presto.

Investigador: Dr. Eduardo Batista Cândido

Endereço: Av. Joaquim José Diniz, n. 20, apt. 402. Belo Horizonte – Minas Gerais – CEP: 31910-520

Tel: (31) 3422-1162/8439-2257

CEP/UFMG: ETIC 326/08

De pleno acordo

Cidade: _____ Data: _____

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

Declaro que é possível a qualquer momento antes da cirurgia revogar o meu consentimento.

Revogo o consentimento prestado no dia _____ E afirmo que não desejo prosseguir na pesquisa e tratamento que me foi proposto, que dou como finalizado nesta data.

Cidade: _____ Data: _____

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

ANEXO IV:

PROTOCOLO DO ENSAIO COM MICROESFERAS FLUORESCENTES UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO - CBA
(CYTOMETRIC BEAD ARRAY)**Preparo das amostras**

- Descongelar as amostras em banho-maria a 37°C. Centrifugá-las na microcentrífuga por 10 min a 14.000 rpm. Recolher o sobrenadante. Esse procedimento deverá ser repetido ao diluir as amostras (Reagente G), caso seja necessário. Nesse caso, usar o sobrenadante.

Preparo dos padrões

- Reconstituir o padrão 15 min antes com 200 µL do Reagente G. Obtém-se solução 10x concentrada. O tubo contendo o padrão reconstituído deve permanecer em repouso por pelo menos 15 min. Durante esse período homogeneizá-lo suavemente em intervalos de 3 min.
- Enumerar 9 tubos de FACS para realização das seguintes diluições: TS, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256.
- Adicionar 900 µL de G no tubo TS e 300 µL de G em todos os outros tubos.
- Adicionar 100 µL da solução padrão estoque 10x no tubo TS. Fazer diluições sucessivas usando o volume de 300 µL.

Obs.: o Reagente G será utilizado como Controle Negativo (CN), sendo necessário um tubo adicional para a reação, totalizando 10 tubos.

Preparo da mistura de beads

- Fazer um pool dos reagentes (A1 até A5 - quimiocinas e A1 até A6 - citocinas) imediatamente antes do uso. Determinar o número de tubos a testar. Serão necessários cerca de 3 µL de cada suspensão de beads para cada ensaio. Encontrar o volume total de beads a ser pipetado.

- O volume de cada suspensão de beads deverá ser adicionado em tubo único para preparação do pool.
- Utilizar 15 μL da mistura de beads para cada amostra.

Obs.: não estocar a mistura de beads. Deve-se agitar bem os frascos contendo as beads antes de pipetá-las (usar vórtex), tanto durante o preparo, quanto na distribuição dos 15 μL /tubo.

Execução das reações

- Adicionar 15 μL das misturas de beads, 25 μL dos padrões, nas respectivas diluições, e 25 μL das amostras nos respectivos tubos.
- Adicionar em todos os tubos 18 μL do Reagente B (Reagente de detecção marcado com PE).
- Incubar 3h, a temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz.
- Adicionar 500 μL do Reagente F em cada tubo.
- Centrifugar a 1300rpm, 7 min, 18°C.
- Aspirar o sobrenadante com bomba de vácuo, deixando aproximadamente 100 μL do sobrenadante em cada tubo.
- Adicionar 100 μL do Reagente F em cada tubo e proceder a leitura.

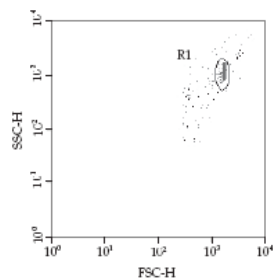
5) Calibração do citômetro

a) Preparação das beads para calibração:

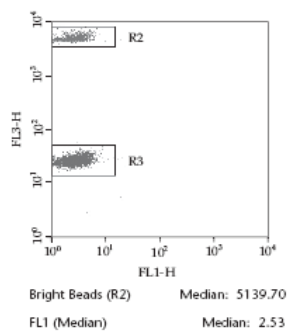
- Identificar tubos de poliestireno com as letras A, B e C.
- Adicionar 50 μL de “Cytometer setup beads” nos tubos A, B e C.
- Adicionar 50 μL do controle positivo FITC no tubo B.
- Adicionar 50 μL do controle positivo PE no tubo C.
- Incubar 30 min, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
- Adicionar 400 μL do Reagente F nos tubos B e C.
- Adicionar 450 μL do Reagente F no tubo A.
- Realizar a calibração do citômetro, segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

b) Instrument Setup

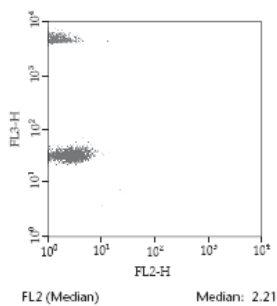
- Abrir a página de leitura da calibração com as beads, acionando set up na janela de aquisição.
- Selecionar a escala no modo Log para FSC e SSC.
- Ajustar o Threshold para 650.
- Realizar a leitura do tubo A, de acordo com as seguintes instruções:
- Em gráficos de FSC x SSC, ajustar o gate R1 na população de beads.



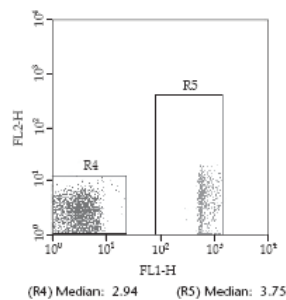
- Ajustar parâmetros de FL3, de forma que a mediana da intensidade de fluorescência da população das beads no topo de FL3 fique em torno de 5000 (R2). A população com a menor fluorescência é determinada como R3.
- Ajustar a mediana de fluorescência de FL1 para 2-2,5.



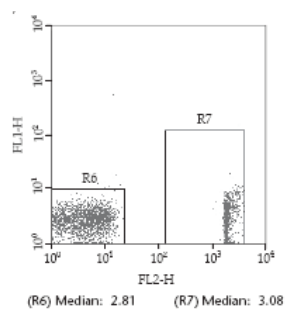
- Ajustar a mediana de fluorescência do FL2 para 2-2,5.



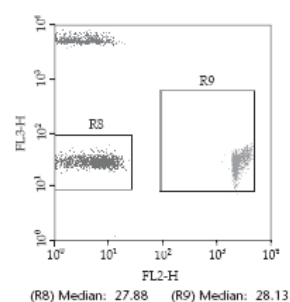
- Realizar a leitura do tubo B e ajustar a compensação de FL2- %FL1. A população com menor fluorescência no FL1 é determinada como R4 e a de maior intensidade no R5. Usar o FL2- %FL1 para ajustar a mediana das duas janelas a valores semelhantes, em relação à FL2.



- Realizar a leitura do tubo C para compensar os parâmetros de FL1- %FL2 e FL3- %FL2. Ajustar o gate R6 na população com menor intensidade em FL2 e R7 na população com maior intensidade. Usando FL1- %FL2, ajustar a mediana de R7 a valores semelhantes aos de R6.



- Ajustar R9 para a população com maior fluorescência em FL2. Usar o controle FL3- %FL2 para ajustar a mediana de R9 a valores semelhantes aos de R8. Ajustar FL2- %FL3 a 0,1 se necessário.



Aquisição das amostras e padrões no citômetro

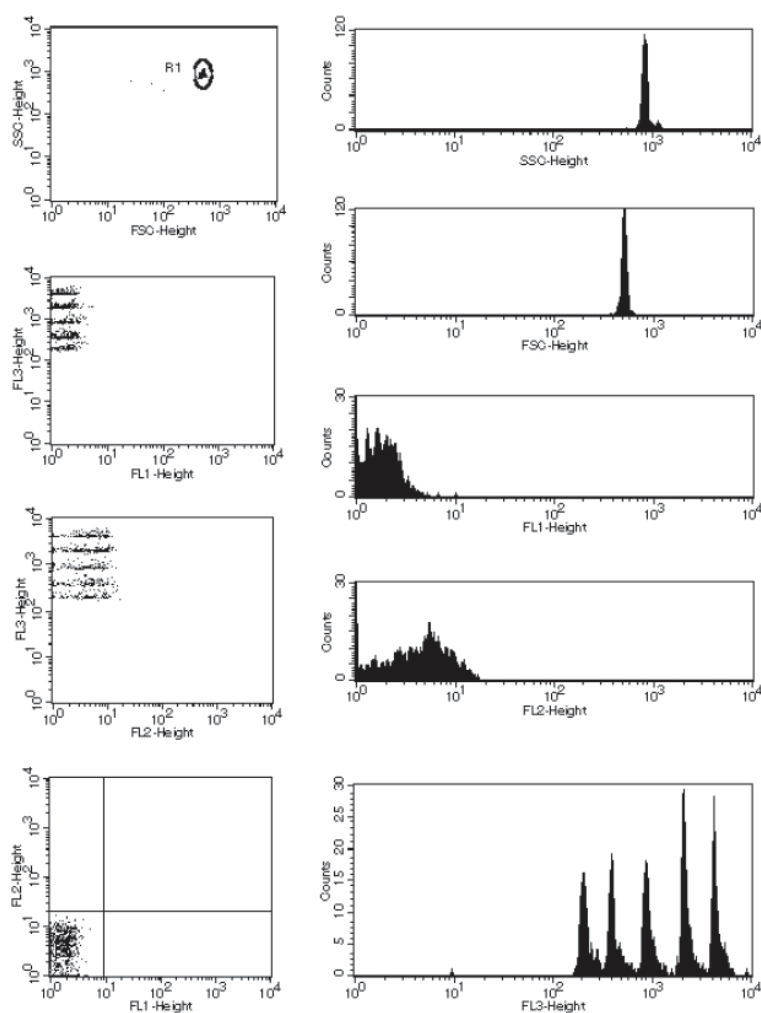
Obs.: colocar os dez primeiros tubos na pasta “Standard”, demais arquivos deverão ficar na pasta “Samples”.

- Abrir o arquivo modelo (BD CBA application).
- Conectar o citômetro e acionar os parâmetros do instrumento determinado após calibração do aparelho. Certificar que no item “Acquisition and Storage” a resolução do canal está em 1024.
- Ajustar o número de eventos a serem contados para 1.800 em R1 (300 beads de cada analito).
- Assegurar que o “gate” R1 está delimitado para conter todas as beads. Acionar a velocidade “High”.
- Proceder a leitura dos tubos na seguinte ordem: CN, ordem crescente de concentração dos padrões, ou seja, ler da maior diluição para a menor até o tubo TS.

Obs.: nome do arquivo (alfa-numérico) – sugestão: duas iniciais do nome de quem fez o experimento, a data sem barras e a extensão 00X. Ex: AT090905.001.

- É importante salientar a necessidade de identificação dos padrões e amostras no item “Sample ID”.

Modelo de aquisição



Análise dos resultados

A análise dos dados deverá ser feita utilizando-se o *software* específico denominado “BD CBA Analysis Software”, por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra será determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) obtidos na leitura da Fluorescência 2.

SUMMARY

Introduction:

The epithelial ovarian cancer (CEO) represents a challenge to the Gynecologic Oncology due to the insidious growth and high lethality. The immune system interacts with the tumor development and determines your progression or regression. This study aims to evaluate the Th1, Th2 and Th17 immune response in women with CEO.

Methods:

We evaluated prospectively 44 women with CEO and 32 women without evidence of malignancy (control group). Samples were collected from tumor/normal ovary, intra-cystic fluid, ascites, and serum. The immune response evaluation was performed using IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α and IFN- γ concentrations by CBA (Cytometric Bead Array). Differences between groups were evaluated by the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis and recurrence and survival by Cox Regression. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results:

There was no difference between groups regarding age and parity. In the group of women with CEO, 12 (27.2%) had stage I/II and 32 (72.7%), stage III/IV. The CEO patients had higher concentrations of TNF- α , IL-4, IL-6 and IL-10 (tumor) and IL-10 and TNF- α (serum) compared to the control group. Ascites and intra-cystic fluid represented the sites with higher concentrations of cytokines in patients with CEO compared to serum and tumor. There was an association of increased serum CA-125 with the highest concentration of IL-10 (intra-cystic fluid) and TNF- α (serum). Patients with indifferntiated tumors had a higher concentration of IL-4 (intra-cystic fluid), IL-6 (liquid and intra-cystic tumor) and

IL-10 (ascites fluid and intra-cystic). Women with stage III/IV had higher concentration of IL-10 (tumor and ascites) and TNF- α (serum and ascites). Women undergoing unsatisfactory cytoreductive surgery had higher concentrations of IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α and low levels of IFN- γ compared to those undergoing optimal debulking. Women with higher concentrations of IL-6 and IL-10 (tumor and ascites) and lower concentrations of IFN- γ (intra-cystic fluid) had a lower overall survival.

Conclusions:

Women with CEO present a predominantly Th2 response and a standard immunosuppression. This profile seems to play an important role in tumor progression, being shown an association of IL-6, IL-10 and IFN- γ with the prognosis of patients with CEO.

Keywords: Epithelial ovarian cancer; Adaptive immune response; Flow cytometry; Cytokines.



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **EDUARDO BATISTA CÂNDIDO** nº de registro 2007670504. No dia **vinte e cinco do mês de novembro de 2011**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE Th1, TH2 E Th17 EM MULHERES COM CÂNCER EPITELIAL DOS OVÁRIOS”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Perinatologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Andrezza Vilaça Belo	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. João Lúcio dos Santos Júnior	Instituição: FASEH	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Luciana Maria da Silva	Instituição: FUNED	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Walter Antônio Prata Pace	Instituição: FCMMG	Indicação: <u>APROVADO</u>

Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de novembro de 2011.

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho Agnaldo Lopes da Silva Filho
 Profa. Andrezza Vilaça Belo Andrezza Vilaça Belo
 Prof. João Lúcio dos Santos Júnior João Lúcio dos Santos Júnior
 Profa. Luciana Maria da Silva Luciana Maria da Silva
 Prof. Walter Antônio Prata Pace Walter Antônio Prata Pace
 Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador Antônio Carlos Vieira Cabral

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador de Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
epg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Agnaldo Lopes da Silva Filho, Andrezza Vilaça Belo, João Lúcio dos Santos Júnior, Luciana Maria da Silva e Walter Antônio Prata Pace, aprovou a defesa da Tese intitulada **“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE Th1, TH2 E Th17 EM MULHERES COM CÂNCER EPITELIAL DOS OVÁRIOS”**, apresentada pelo doutorando **EDUARDO BATISTA CÂNDIDO**, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Perinatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 25 de novembro de 2011.

Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Orientador

Prof. Andrezza Vilaça Belo

Prof. João Lúcio dos Santos Júnior

Prof. Luciana Maria da Silva

Prof. Walter Antônio Prata Pace