

**JOÃO OSCAR DE ALMEIDA FALCÃO JÚNIOR**

**Avaliação de quimiocinas séricas em mulheres  
com câncer epitelial de ovário**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área de concentração Ginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Ginecologia

**Orientador: Prof. Dr Paulo Traiman**

**Co-orientadores: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho,  
Profa. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho**

**Botucatu / São Paulo  
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Falcão, João Oscar de Almeida.

Avaliação de quimiocinas séricas em mulheres com câncer epitelial de ovário / João Oscar de Almeida Falcão Júnior. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientador: Paulo Traiman

Co-orientadores: Agnaldo Lopes da Silva Filho e Andréa Teixeira de Carvalho

Assunto CAPES: 40101150

1. Ovários - Câncer

CDD 616.99465

Palavras-chave: Câncer de ovário; CBA (Cytometric Bead Array); Interleucinas; Quimiocinas; Resposta imune



---

*Dedicatória*

---

*Dedico esta tese...*

*A meu Pai, João Oscar, e aos meus tios,  
Renato e Vera, os quais com amor, carinho,  
dedicação e constante incentivo, me ajudaram a  
construir o que há de melhor em mim.*

*A minha querida esposa, Débora, meu amor,  
meu porto seguro.*

*Aos meus filhos, Gustavo, Gabriela e  
Augusto, fontes de minha energia, alegria da  
minha vida.*

*A minha sogra, Teresa, apoio incondicional,  
sempre.*

*A minha mãe, in memoriam*

---

*Sou profundamente grato ao Professor Paulo Traiman, que me recebeu de braços abertos e me deu a oportunidade de aqui chegar.*

*Reverencio e agradeço ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho e à Dra. Andréa Teixeira de Carvalho. Com trabalho, apoio, e exemplo, foram o motor propulsor desta minha jornada.*

---



---

*Agradecimientos*

---

*Agradeço, inicialmente, à Dra. Rivia Mara Lamaita, que me mostrou e estimulou a dar os primeiros passos deste caminho, e ao Professor Sérgio Augusto Triginelli, constante estímulo em todo o processo.*

*Aos meus colegas de trabalho, em especial a Adriana Coelho da Silveira e Paulo Roberto Mansoldo Alves, que com sua disponibilidade e apoio, foram muitas vezes auxiliares ou, até mesmo, substitutos na luta diária.*

*Ao Dr. José Salvador Silva, ao Dr. Henrique Moraes Salvador Silva e a todos do Hospital Mater Dei que me ensinaram uma filosofia de trabalho.*

*Ao Dr. João Pedro Junqueira Caetano e a toda a equipe da Pro-criar, os quais me mostraram que na vida não existe espaço para acomodações.*

*Ao Dr. Walter Pace, que sempre confiou em minha capacidade de trabalho.*

*Ao Dr. Ricardo Melo Marinho pelo exemplo de profissional.*

*À Coordenadora do curso de pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Professora Dracema de Mattos Paranhos Calderon, pela oportunidade e a acolhida.*

*Aos Professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Rogério Dias, Gilberto Uemura, Jorge Náhas Neto, Ana Glória Pontes e Eliana Aguiar Petri Náhas, que me receberam com cortesia e atenção, e a todos do Departamento de Ginecologia e da pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial à Ana Cláudia, secretária do departamento e à Selma, bibliotecária, que com gentileza e atenção, fizeram até as distâncias parecerem menores.*

---

*Aos alunos da iniciação científica, Gustavo Ferreira de Freitas e Rogéria Werneck pela ajuda inestimável.*

*Às pacientes que, com grande generosidade, nos deram a oportunidade de buscar, em suas histórias, motivação e meios para a realização deste estudo.*

---





---

*Epigrafe*

---

*“Não viverei em vão, se puder  
Salvar de partir-se um coração,  
Se eu puder aliviar uma vida  
Sofrida, ou abrandar uma dor,  
Ou ajudar exangue passarinho  
A subir de novo ao ninho –  
Não viverei em vão.”*

*Emily Dickinson  
Tradução de Alta de Oliveira Gomes*

---



---

*Índice*

---

**Siglas****Glossário****Resumo**

<b>1. Introdução</b> .....	<b>20</b>
1.1. Resposta imune .....	21
1.2. Quimiocinas.....	23
1.3. Resposta imune e câncer .....	27
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>29</b>
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
<b>3. Casuística e Métodos</b> .....	<b>31</b>
3.1. Cálculo amostral.....	32
3.2. Casuística.....	33
3.2.1. Critérios de inclusão .....	33
3.2.2. Critérios de exclusão .....	33
3.3. Métodos.....	34
3.3.1. Técnica cirúrgica .....	34
3.3.2. Avaliação histológica .....	34
3.3.3. Coleta das amostras sanguíneas .....	35
3.3.4. Dosagem das quimiocinas CCL 2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL8 .	35
3.4. Análise estatística .....	41
<b>4. Resultados</b> .....	<b>42</b>
4.1. Características gerais da amostra.....	43
4.2. Avaliação das quimiocinas CCL 2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL8 nas pacientes com câncer epitelial de ovário e controles .....	43
<b>5. Discussão</b> .....	<b>48</b>
5.1. Metodologia.....	49
5.2. Resposta imune no câncer de ovário .....	51
5.3. Considerações finais .....	54

<b>6. Conclusões .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>58</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>67</b>
Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Mater Dei (CEP).....	68
Consentimento livre e esclarecido.....	69
Estadiamento do câncer epitelial de ovário (FIGO).....	71
<b>9. Summary .....</b>	<b>72</b>

---



---

*Siglas*

---

---

<b>CBA</b>	<i>Cytometric bead array</i> – ensaio com microesferas fluorescentes empregando citometria de fluxo
<b>CC</b>	Família de quimiocinas com duas cisteínas equivalentes próximas à porção amino-terminal.
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocina com duas cisteínas equivalentes próximas à porção amino-terminal.
<b>CEO</b>	Câncer epitelial do ovário
<b>CEP</b>	Comitê de Ética e Pesquisa
<b>CXC</b>	Família de quimiocinas com duas cisteínas equivalentes separadas por um aminoácido qualquer.
<b>CXCR</b>	Receptor de quimiocina com duas cisteínas equivalentes separadas por um aminoácido qualquer.
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.</i>
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>FL</b>	Fluorescência
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>IL</b>	Interleucina.
<b>kda</b>	Kilodalton
<b>mm</b>	Milímetro
<b>min</b>	Minuto
<b>MCP 1</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>MIP 1</b>	Proteína inflamatória de macrófago 1
<b>n</b>	Número total da amostra
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pg/ml</b>	Picograma por mililitro
<b>RANTES</b>	<i>Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i>
<b><math>\tau</math></b>	Coeficiente de Kendall tau
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>U/ml</b>	Unidades por mililitro
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular

---



---

*Glossário*

---



<b>Células dendríticas</b>	Células reticulares interligantes, são células com morfologia ramificada ou dendrítica e representam os mais potentes estimulantes das respostas de células T, pela capacidade de apresentação antigênica.
<b>Células NK</b>	(NK= <i>natural Killer</i> ) são linfócitos não-T e não-B, portadores de morfologia granular, que matam certas células tumorais. Importantes na imunidade inata frente aos vírus e a outros agentes intracelulares, assim como nos casos de citotoxicidade celular mediada por anticorpos.
<b>Células T</b>	Linfócitos T. Constituem um subgrupo de linfócitos definidos pelo seu desenvolvimento no timo e por receptores heterodiméricos associados às proteínas do complexo CD3.
<b>Citocinas</b>	São proteínas sintetizadas por células que afetam o comportamento de outras células. Atuam em receptores específicos das células-alvo.
<b>Interleucina.</b>	Termo usado para citocinas produzidas por leucócitos.
<b>Proteína G</b>	Proteínas que ligam GTP, convertendo-a a GDP no processo de transdução do sinal celular.
<b>Quimiocinas</b>	São pequenas proteínas quimio-atraentes, envolvidas na migração e na ativação de células, especialmente fagocitárias e linfocitárias.
<b>Quimiocinese</b>	Aumento da atividade de uma substância, pela ação de um catalisador químico.
<b>Quimiotaxia</b>	Processo de locomoção orientada ao longo de um gradiente químico.

---



---

*Resuma*

---

**Introdução:** O sistema imune, por meio da coordenação do funcionamento de várias células e proteínas, além de proteger contra infecções, atua na resposta do organismo contra células neoplásicas. As quimiocinas associam-se à modulação da resposta imune e apresentam importante papel na mediação do tráfego celular. O objetivo deste estudo é avaliar as quimiocinas, CCL2/MCP-1, CCL3/ MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8 em mulheres com câncer epitelial de ovário (CEO). **Métodos:** Foram estudadas prospectivamente 16 pacientes com CEO e 18 pacientes saudáveis sem evidências de neoplasias malignas (grupo controle). As pacientes com CEO foram submetidas à laparotomia para citoredução. As dosagens das quimiocinas foram realizadas por meio da técnica de ensaio citofluorométrico com microesferas fluorescentes - Cytometric bead array (CBA) Foram utilizados os teste de Mann-Whitney e Kendall's tau quando apropriados, sendo o valor de  $p < 0,05$  considerado significativo. **Resultados:** A idade das pacientes variou de 23 a 89 anos ( $58,7 \pm 2,3$  anos). O estadiamento do tumor (FIGO) foi I em 4 casos (25%), III em 5 casos (31,3%) e estágio IV em 7 casos (43,8%). As dosagens séricas de CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 $\beta$  foram menores nas pacientes com CEO em comparação com o grupo controle ( $p=0,021$  e  $p=0,031$ ; respectivamente). Não houve diferença entre os grupos nos níveis de CCL3/ MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8. O estadiamento tumoral não se associou com os níveis séricos das quimiocinas. A dosagem sérica de CA-125 não apresentou correlação com as quimiocinas estudadas. **Conclusões:** A resposta imune pode estar associada ao estabelecimento/manutenção do CEO e o estudo das quimiocinas pode ser um mecanismo para esta avaliação.

**Palavras chave:** Quimiocinas, Câncer epitelial de ovário, resposta imune, CBA (Cytometric Bead Array), CA-125.

---



---

## *1. Introdução*

---

O câncer epitelial do ovário (CEO) representa um desafio à Oncologia Ginecológica, devido ao seu caráter insidioso e alta letalidade [1]. Nos Estados Unidos, corresponde a primeira causa de morte entre os tumores ginecológicos e a quarta causa de óbito entre as mulheres [2]. É a oitava neoplasia maligna mais diagnosticada em mulheres no Brasil [3], correspondendo a 1,8% dos cânceres ginecológicos [4]. A sintomatologia inespecífica e a falta de métodos propedêuticos de rastreamento eficazes dificultam o diagnóstico precoce dessa neoplasia [5] [6]. Aproximadamente 2/3 dos casos são diagnosticados nos estádios III e IV, com uma sobrevida em cinco anos variando de 10 a 20% [7]. Apesar dos avanços no tratamento cirúrgico e quimioterápico a mortalidade por CEO não se modificou nas últimas duas décadas [8].

### **1.1 Resposta imune**

O crescimento dos tumores malignos é determinado, em grande parte, pela capacidade de proliferação das células tumorais e pela capacidade destas células de invadir os tecidos do hospedeiro, superando seus mecanismos de defesa [9]. Como componente desta “interação” neoplasia/hospedeiro, a inflamação é uma complexa reação a agentes agressores, resultando em aumento dos leucócitos circulantes, células de tecido conectivo e constituintes extra-celulares como proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e glicoproteínas (fibronectina e proteoglicanas) [10]. O

---

sistema imune tem como principais agentes: células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, basófilos e linfócitos (células B, células T e células NK). A interação destas células, seus produtos e o agente agressor são a base para a ação de defesa do hospedeiro e sua presença já foi demonstrada em amostras teciduais de processos patológicos e neoplásicos, como o CEO [11, 12].

A resposta imune pode ser inata ou adaptativa. A imunidade inata é aquela associada às fases iniciais da resposta imune, reconhece e responde à presença de agentes patogênicos sem uma especificidade definida, sempre está presente e não aumenta com a repetida exposição a um dado agente agressor, [13]. Por outro lado, a imunidade adaptativa acentua mecanismos efetores similares àqueles da resposta inata, direcionando-os com maior precisão, ou seja, existe especificidade de resposta. A resposta adaptativa pode ser direcionada pela imunidade celular ou pela imunidade humoral com produção de anticorpos [14]. No que diz respeito à imunidade celular, a via de resposta imune dominante está associada à diferenciação das células CD4 virgem em células  $T_H1$  ou  $T_H2$  no tecido linfóide. Células  $T_H1$  estão associadas à imunidade mediada por células e à produção de classes de anticorpos opsonizantes (predominantemente IgG). As células  $T_H2$  proporcionam imunidade humoral e estão envolvidas com a produção de anticorpos, especialmente IgM, IgA e IgE. [11]. Os fatores determinantes deste processo não são ainda inteiramente compreendidos. Sabe-se que as citocinas e quimiocinas presentes nos tecidos no início da fase de diferenciação têm grande influência no processo [15].

---

Macrófagos e linfócitos ativados atuam de forma interativa na liberação de citocinas que amplificam a resposta imune [16]. As citocinas são pequenas proteínas (~25KDa) liberadas por várias células do organismo, normalmente em resposta a um estímulo ativador, e induzem resposta por meio da ligação a receptores específicos [17]. Representam um grande número de moléculas que participam da resposta imune e de processos fisiológicos e patológicos no organismo. Dentre elas, podemos citar: interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de crescimento e fatores estimulantes de colônias de leucócitos [10].

## **1.2. Quimiocinas**

As quimiocinas compreendem uma grande família de citocinas quimiotáticas estruturalmente homólogas, com aproximadamente 8 a 10 kDa de tamanho. Uma característica comum ao grupo é a capacidade de estimular a motilidade (quimiotaxia) e os movimentos dirigidos (quimiotaxia) dos leucócitos [18]. Como foram descobertas em ensaios para citocinas, foram inicialmente denominadas interleucinas. A primeira quimiocina descoberta em 1987 foi o fator plaquetário 4 (CXCL4). Entretanto, só em 1991 foram reconhecidas as propriedades quimiotáticas das quimiocinas, com a identificação da IL-8 (CXCL8) [19]. Existem mais de 40 tipos de quimiocinas, que se dividem principalmente em dois grupos dependendo da configuração dos dois primeiros resíduos de cisteína: C-C e C-X-C [20].

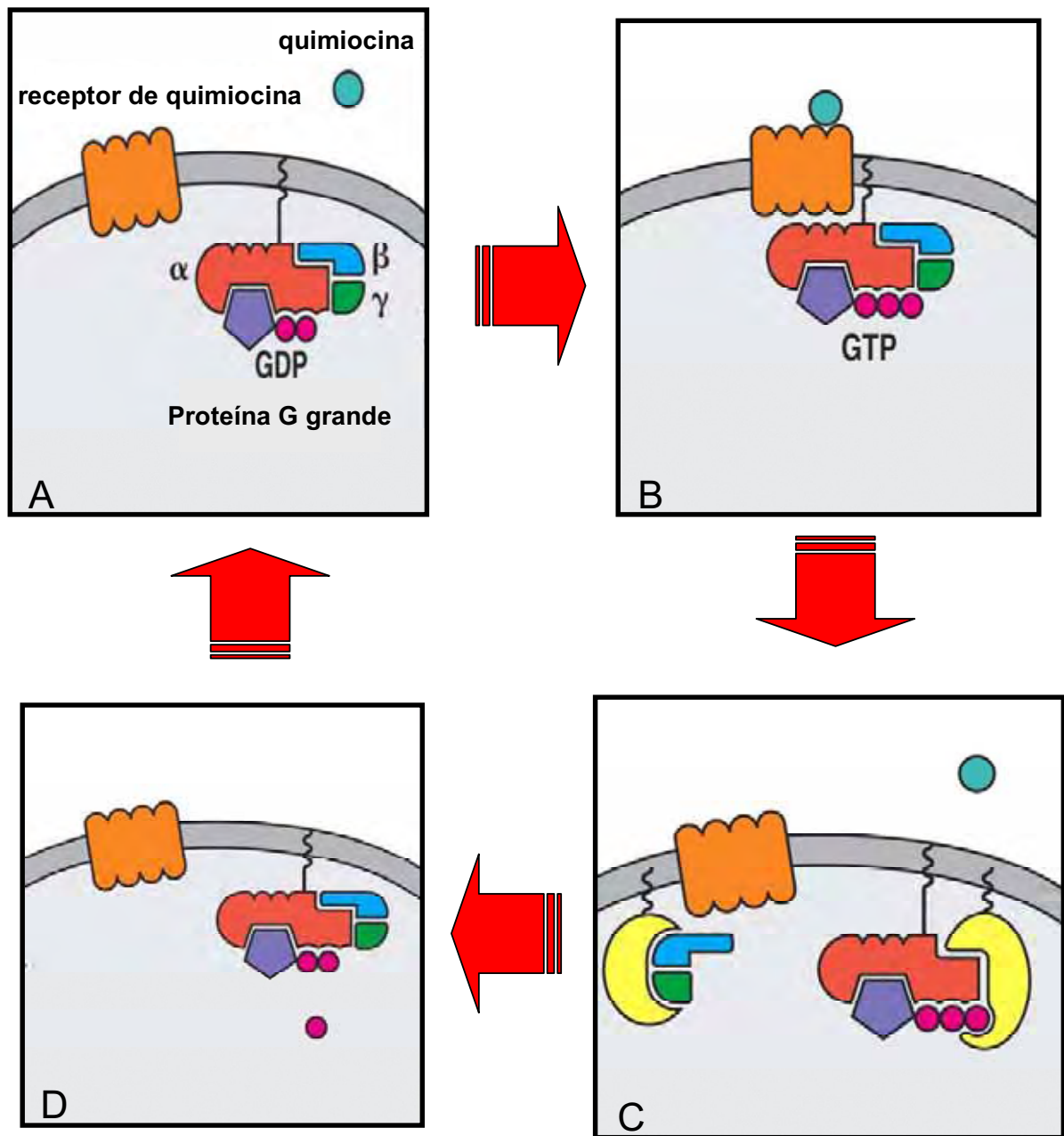
---

As quimiocinas atuam por meio da ligação com seus receptores, constituídos por proteínas integrais de membrana, acoplados à proteína G [21] ( fig 1). As quimiocinas podem ser produzidas e liberadas por uma grande variedade de tipos celulares em resposta a produtos bacterianos, vírus e agentes que causam danos físicos [22, 23]. Várias condições fisiológicas e patológicas requerem a participação das quimiocinas, incluindo ontogênese, inflamação, infecção, trauma tecidual, alergia, doenças cardiovasculares, assim como os tumores malignos [24].

As quimiocinas, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8 formam um grupo de quimiocinas com inter-relações com os principais agentes da resposta imune, permitindo uma avaliação indireta, mas abrangente de diversos aspectos da interação tumor-hospedeiro, sendo responsáveis pela migração de vários tipos celulares para o foco inflamatório [25-27]. Estas quimiocinas estão associadas à resposta imune inata e adaptativa e a processos como inflamação crônica, imunidade TH1 e TH2, ativação de células T e liberação de histamina, angiogênese, dentre outros [25-28].

---





Adaptada: de Janeway Jr. et al. 2007 pg. 230

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de sinalização celular das quimiocinas. **A** - Forma inativa com proteína G ligada ao GDP. **B** - Quimiocina se liga ao seu receptor e induz a ligação da proteína G ao receptor e o GDP é trocado por GTP. **C** - A proteína G é dissociada em subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  que podem ativar outras proteínas na superfície interna da membrana celular. **D** - Fim da resposta ativada com a clivagem do GTP em GDP pela subunidade que contém uma GTPase intrínseca, o que permite a reassociação das subunidades da proteína G.

**TABELA 1-** Caracterização das quimiocinas, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL8. [25, 26, 28]

Quimiocinas	Origem	Células que atrai	Ação
CCL2 (MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1)	Monócitos, Macrófagos, Fibroblastos,  Queratinócitos.	Monócitos, Células T e NK, Basófilos, Células dendríticas.	Ativação de macrófagos, Liberação de histaminas. Promove imunidade T <sub>H</sub> 2.
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ - Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa)	Monócitos, Células T, Mastócitos, Fibroblastos.	Monócitos, Células T e NK, Basófilos, Células dendríticas.	Promove imunidade T <sub>H</sub> 1, associada à defesa antiviral.
CCL4 (MIP-1 $\beta$ – Proteína inflamatória de macrófago 1 beta)	Monócitos, Macrófagos Neutrófilos, Endotélio.	Monócitos, Células T e NK, Células dendríticas.	Promove imunidade T <sub>H</sub> 1, associada à defesa antiviral.
CCL5 (RANTES - Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted)	Células T, Endotélio e Plaquetas.	Monócitos, Células T e NK, Basófilos, Células dendríticas.	Degranula basófilos, Ativa células T. Inflamação crônica. Rejeição de enxertos.
CXCL8 [IL (interleucina) 8]	Monócitos, Macrófagos, Fibroblastos, Queratinócitos, Células endoteliais.	Neutrófilos, Células T virgens.	Mobiliza, ativa e degranula os neutrófilos. Angiogênese.

### **1.3. Resposta imune e câncer**

As respostas imunes inata e adaptativa participam e influenciam todo processo de carcinogênese. Por esse motivo, é possível que certos tumores não se manifestem, sendo eliminados logo em sua origem. Em contrapartida, ao destruir células susceptíveis, a reação imune contribui para selecionar clones mais resistentes e agressivos [29]. Pressupõe-se que a avaliação da resposta imune em pacientes com neoplasia maligna do trato genital feminino seja de grande importância para o estudo do comportamento tumoral em relação ao hospedeiro [30].

Atualmente, as quimiocinas são consideradas mais do que mediadores do tráfego celular; no entanto, os aspectos específicos dos mecanismos bioquímicos relacionados às suas ações precisam ser melhor definidos. Estas ações podem apresentar características individualizadas de neoplasia para neoplasia [28]. Em modelo animal foi demonstrado que as quimiocinas se associam com a angiogênese e com o crescimento tumoral. Algumas podem iniciar ou incrementar a resposta imunológica do hospedeiro contra a implantação tumoral ou ainda inibir a neovascularização. Entretanto, pode haver uma ação contrária, favorecendo o crescimento neoplásico e a metastatização, por aumento da proliferação celular, estimulando a mobilidade e migração celular ou potencializando a angiogênese no tecido tumoral [33, 34].

Estudos apresentam resultados conflitantes em relação ao papel das quimiocinas no CEO [32, 35, 36]. A expressão das diversas

---

quimiocinas e quais as mais importantes no CEO, bem como os mecanismos moleculares e a ação específica dessas proteínas ainda não está muito bem definido [32]. O CEO apresenta como característica importante, a disseminação peritoneal, ou seja, células tumorais que descamam da superfície tumoral e se implantam no omento e peritônio [37]. Demonstrou-se que o estroma submesotelial do peritônio de pacientes com CEO tem um extenso infiltrado de células inflamatórias [38]. Existem também evidências que sugerem uma associação de macrófagos e monócitos na progressão do CEO [35, 39, 40]. Dessa forma, a avaliação dos níveis de quimiocinas plasmáticas poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de mobilização de leucócitos para elaboração da resposta inflamatória ao tumor nos tecidos afetados. Além disso, o estudo das quimiocinas pode permitir a identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos para esta neoplasia, tão desafiadora na prática diária da oncologia ginecológica.

---



---

## *2. Objetivos*

---

## **2.1. Objetivo geral**

Avaliar as quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em mulheres com CEO.

## **2.2. Objetivos específicos**

1. Comparar os níveis séricos de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em pacientes com CEO e no grupo controle.

2. Avaliar a correlação/associação entre níveis séricos de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em pacientes com CEO com o CA-125 sérico e o estadiamento tumoral.

---



---

### *3. Casuística e Métodos*

---

### **3.1. Cálculo amostral**

Foram utilizados dois procedimentos para definição do tamanho da amostra. No primeiro, foi buscado qual seria o tamanho da amostra necessária para obter um erro da estimativa que seja aceitável para os padrões do estudo, baseado em achados de estudos similares [32]. As análises demonstraram que uma amostra global de 31 elementos produziria uma margem de erro de 10% com 90% de confiança para as médias de CCL2 e CXCL8. Avaliando, também, o poder do teste encontrou-se que 16 pacientes em cada grupo garantiriam ao estudo um poder de 90%, considerando um nível alfa de 0,1%. Finalmente, os cálculos mostraram que uma amostra de 26 pacientes garantiria um poder de 80% para correlações maiores que 0,5.

### **3.2. Casuística**

Foram avaliados, prospectivamente, 34 mulheres atendidas no serviço de ginecologia e oncologia ginecológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Hospital Mater Dei, no período de maio/2006 a março/2007. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) do Hospital Mater Dei (parecer número 0026.0.170.000-07 – Anexo I)

---



As pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo 1 (casos): 16 pacientes com diagnóstico de CEO, com proposta de tratamento cirúrgico.
- Grupo 2 (controles): 18 pacientes híginas e sem evidências de neoplasias malignas.

### **3.2.1. Critérios de inclusão**

- Pacientes com diagnóstico de CEO e proposta de tratamento cirúrgico (casos).
- Pacientes híginas e sem evidências de neoplasias malignas (controle).
- Termo de consentimento livre e esclarecido da paciente, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo II).

### **3.2.2. Critérios de exclusão**

- Pacientes submetidas a tratamento prévio com quimioterapia e/ou radioterapia.
  - Pacientes com diagnóstico de doenças do sistema imune e/ou uso de corticóides ou imunossupressores nos últimos 6 meses.
-

- Presença de evidência à laparotomia de algum processo infeccioso agudo (casos).
- Não concordância do diagnóstico histológico prévio com o exame anátomo-patológico da peça cirúrgica (casos).
- Não concordância da paciente em participar do estudo.

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. 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. Realizaram-se também procedimentos cirúrgicos adicionais para obtenção de citoredução tumoral quando possível. As peças cirúrgicas eram encaminhadas para análise histopatológica. O estadiamento do câncer de ovário foi realizado de acordo com as recomendações da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - FIGO. (Anexo III).

#### **3.3.2. Avaliação histológica**

A peça cirúrgica retirada foi fixada imediatamente com formaldeído a 10%. O material foi identificado numericamente e encaminhado

---

para análise anátomo-patológica. 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° (idem) e incluídas em blocos de parafina. O estudo histológico foi realizado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), procedendo-se à classificação do tumor de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) [41].

### **3.3.3. Coleta das amostras sangüíneas.**

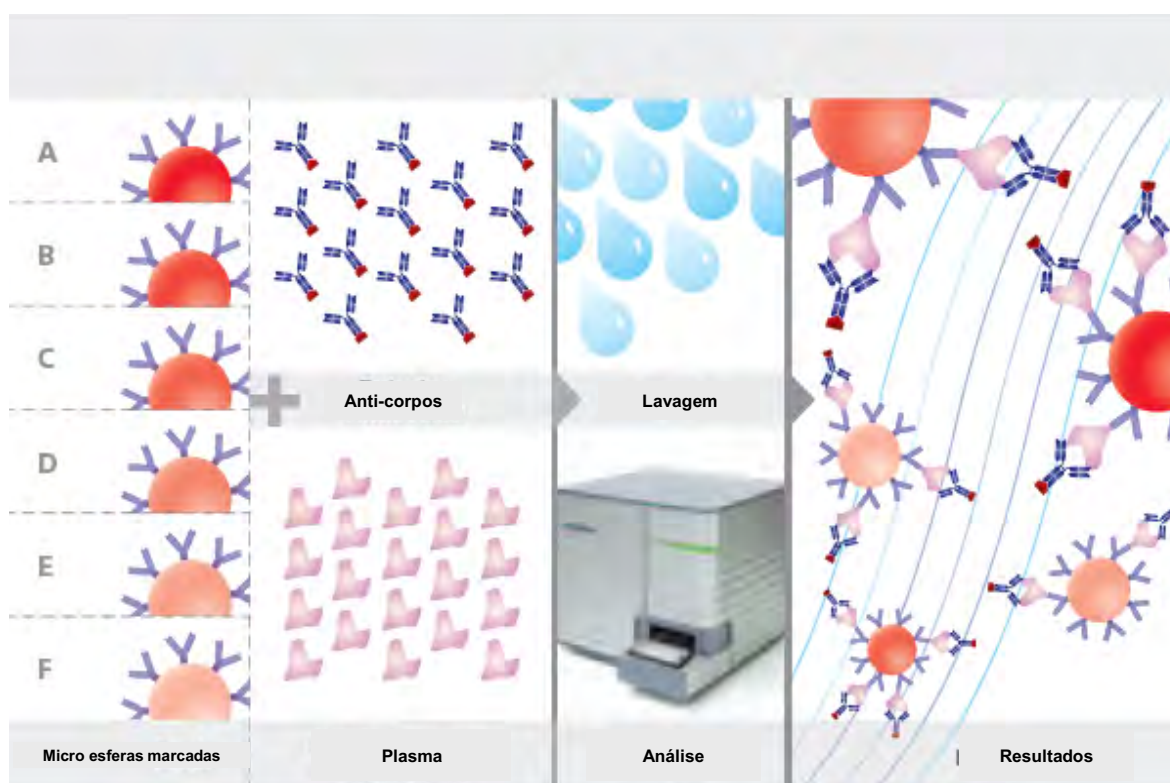
Coleta de sangue periférico foi realizada no pré-operatório imediatamente antes da indução anestésica para o grupo de casos e no setor de análises clínicas do Hospital das Clínicas da UFMG para o grupo controle. O sangue foi centrifugado e o soro estocado a -80°C até o momento das dosagens laboratoriais.

### **3.3.4. Dosagem das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8.**

As dosagens foram realizadas por meio da técnica de *Cytometric bead array* (CBA) – ensaio com microesferas fluorescentes empregando-se citometria de fluxo, que se baseia no uso de esferas de poliestireno, como suporte sólido para reação de imunofluorescência, marcadas com diferentes intensidades de fluorescência (FL) 3, marcadas seletivamente com anticorpos anti-analitos de interesse (quimiocinas). A análise quantitativa das quimiocinas é realizada em função do deslocamento

---

dos grupamentos de microesferas em gráficos de distribuição pontual de FL2 x FL3, obtidos pelo citômetro de fluxo e utilização de curvas-padrão para cada quimiocina avaliada. As análises foram realizadas com o auxílio do software específico para o CBA (BD CBA™ software). A figura 3.1 mostra a representação esquemática dos procedimentos necessários para dosagem das quimiocinas, empregando-se essa metodologia.



Representação esquemática da dosagem realizada pela técnica CBA

Nota: Adaptado do bulário do Cytometric Bead Array Flex Set System BD – Biosciences, 2004-2005.

**Figura 3.1** – Representação esquemática da técnica de CBA.

Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada dos protocolos originais propostos por Chen et al. (1999) [42], como descrito a seguir:

Alíquotas de 25 $\mu$ L de soro diluído 1:5 com diluente G (reagente do kit CBA), alíquotas de 25 $\mu$ L dos padrões de quimiocinas, submetidos à diluição seriada com diluente G ("Top Standard" – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 $\mu$ L de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon – BD, EUA). Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 15 $\mu$ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti- CCL2/MCP-1, CCL3/ MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8 (CBA Human Chemokine Kit II, BD, EUA), com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 $\mu$ L da solução F (tampão de lavagem, reagente do kit CBA), centrifugadas a 600g, por 10 minutos, a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então re-incubadas na presença de 20 $\mu$ L do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-quimiocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 $\mu$ L da solução F, centrifugadas a 600g, por 10 minutos, a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 $\mu$ L de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo FACScan

---

(Becton Dickinson, CA, EUA).

Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foram obtidos com base em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (fig. 3.2A). Para a análise dos dados as microesferas, conjugadas com anticorpos monoclonais de captura correspondentes a cada quimiocina, foram inicialmente segregadas em gráficos de distribuição pontual de FL-3 x FL-2, onde as cinco esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL-3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL-2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada quimiocina presente na amostra (fig. 3.2 B e C). Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa de quimiocinas séricas, curvas padrão foram construídas, utilizando-se os dados dos padrões de quimiocinas em concentrações conhecidas (20pg/mL – 5000pg/mL) fornecidas pelo fabricante do kit e empregada para determinar as concentrações de cada quimiocina nos soros testados. Um modelo de ajustamento, através da curva do quarto parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras que não caíam dentro dos limites da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

O processamento e avaliação das amostras foram realizados no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, sob a coordenação da Dr<sup>a</sup>. Andréa Teixeira Carvalho.

---

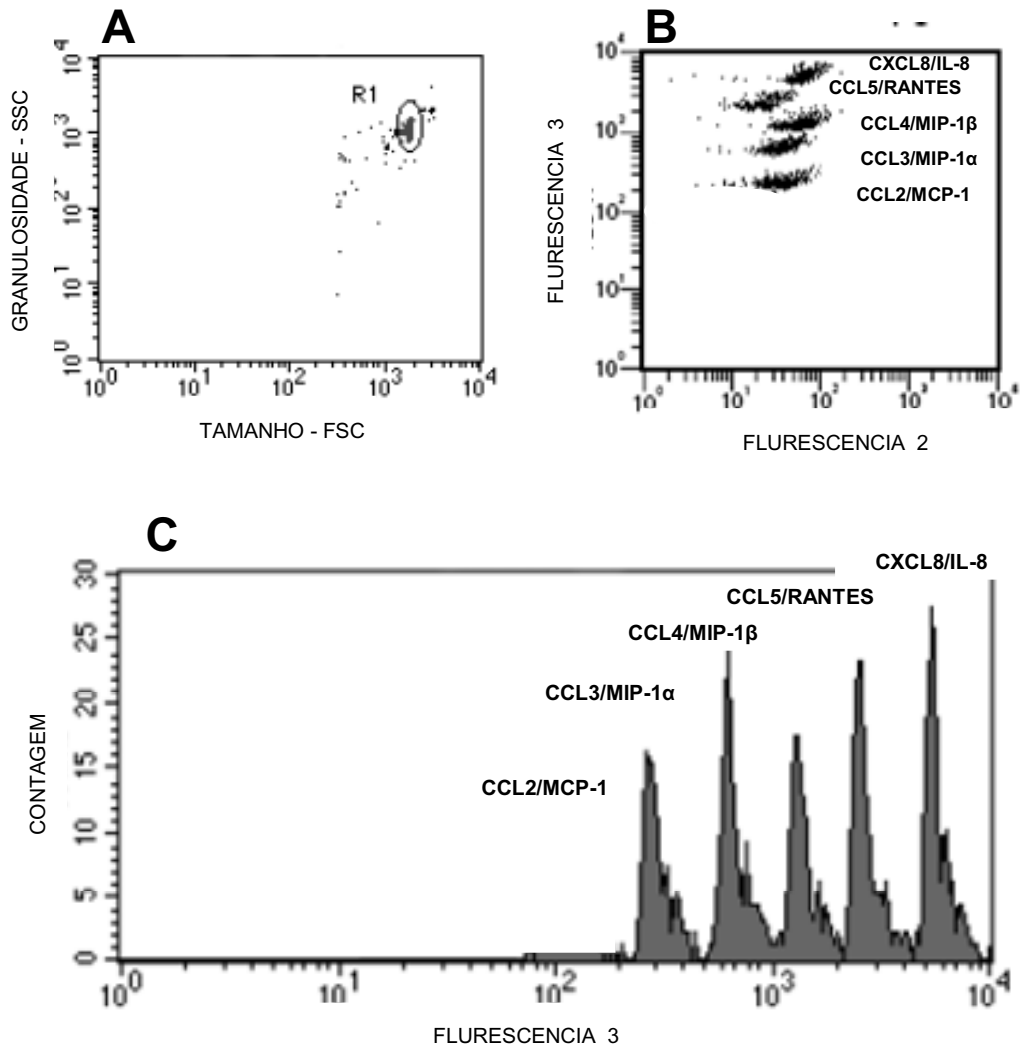
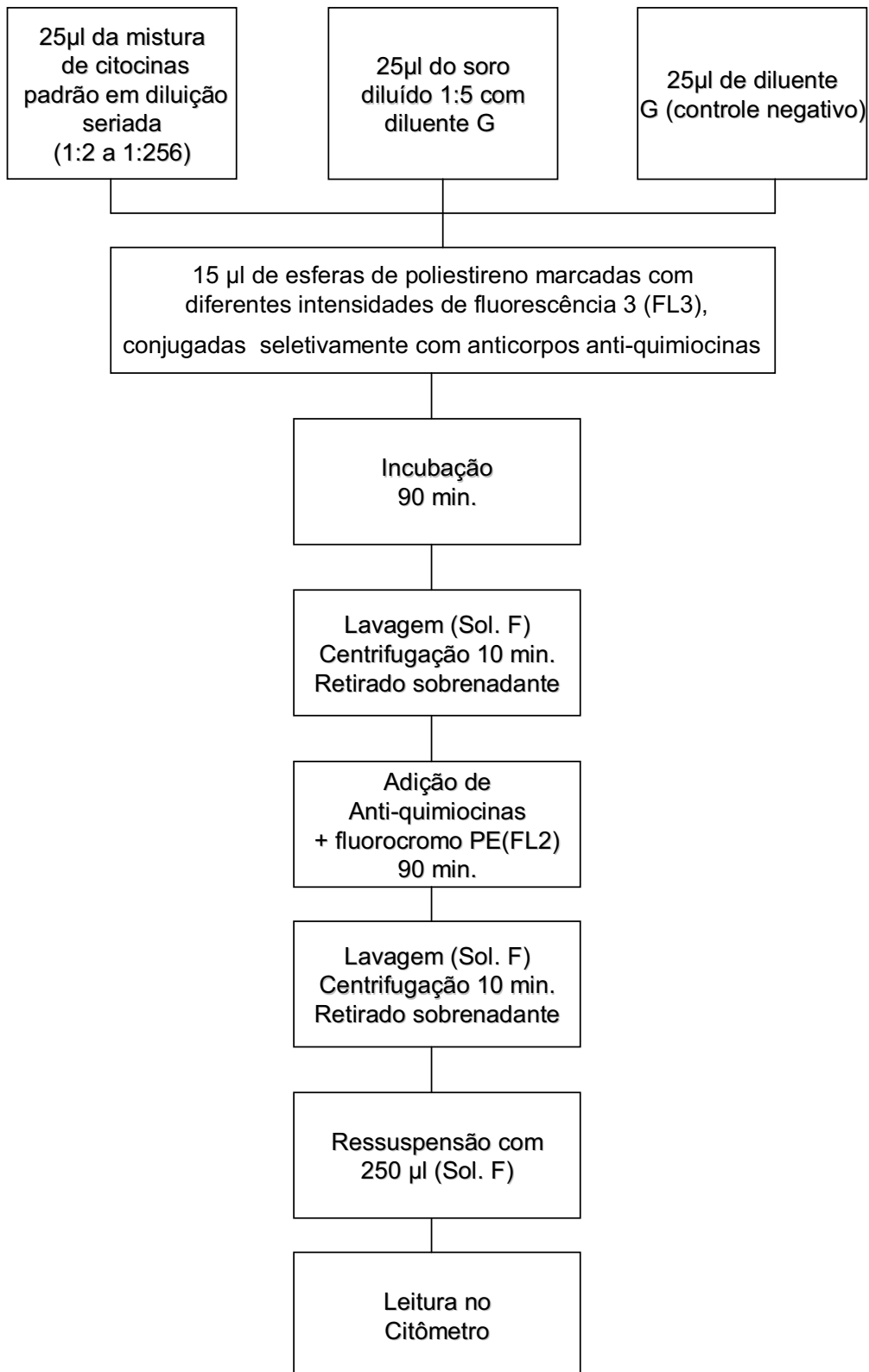


Figura 3.2 – Representação gráfica dos resultados obtidos pela metodologia CBA.



**Figura 3.3** – Fluxograma do processo de dosagem das quimiocinas



### 3.4. Análise estatística

As fichas preenchidas foram revisadas, sendo as suas informações codificadas e digitadas em banco de dados no programa SPSS para Windows versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), que desenvolveu os cálculos posteriores.

Foi avaliado o pressuposto de normalidade e com este objetivo aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov que indicou que a distribuição das dosagens séricas das quimiocinas não seguem a normalidade ( $p < 0,001$ ). Portanto, nesta análise foram empregados testes não paramétricos, que são mais robustos a violação deste pressuposto. A idade e a paridade foram descritas por meio de suas médias, valores mínimos, máximos e desvio padrão.

As diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. O mesmo teste foi utilizado para a comparação das dosagens séricas das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em mulheres com CEO com o grupo controle e para a avaliação da associação das dosagens séricas das quimiocinas em mulheres com CEO com o estadiamento (FIGO). Nesta última, os estadios foram agrupados em I/II e III/IV, para se evitar dispersão acentuada dos casos entre as variáveis. As correlações dos níveis séricos do CA-125 e do estadiamento clínico com as dosagens das quimiocinas em mulheres com CEO foram feitas pelo teste de *Kendall's tau*. As diferenças ou correlações com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

---



---

## 4. Resultados

---

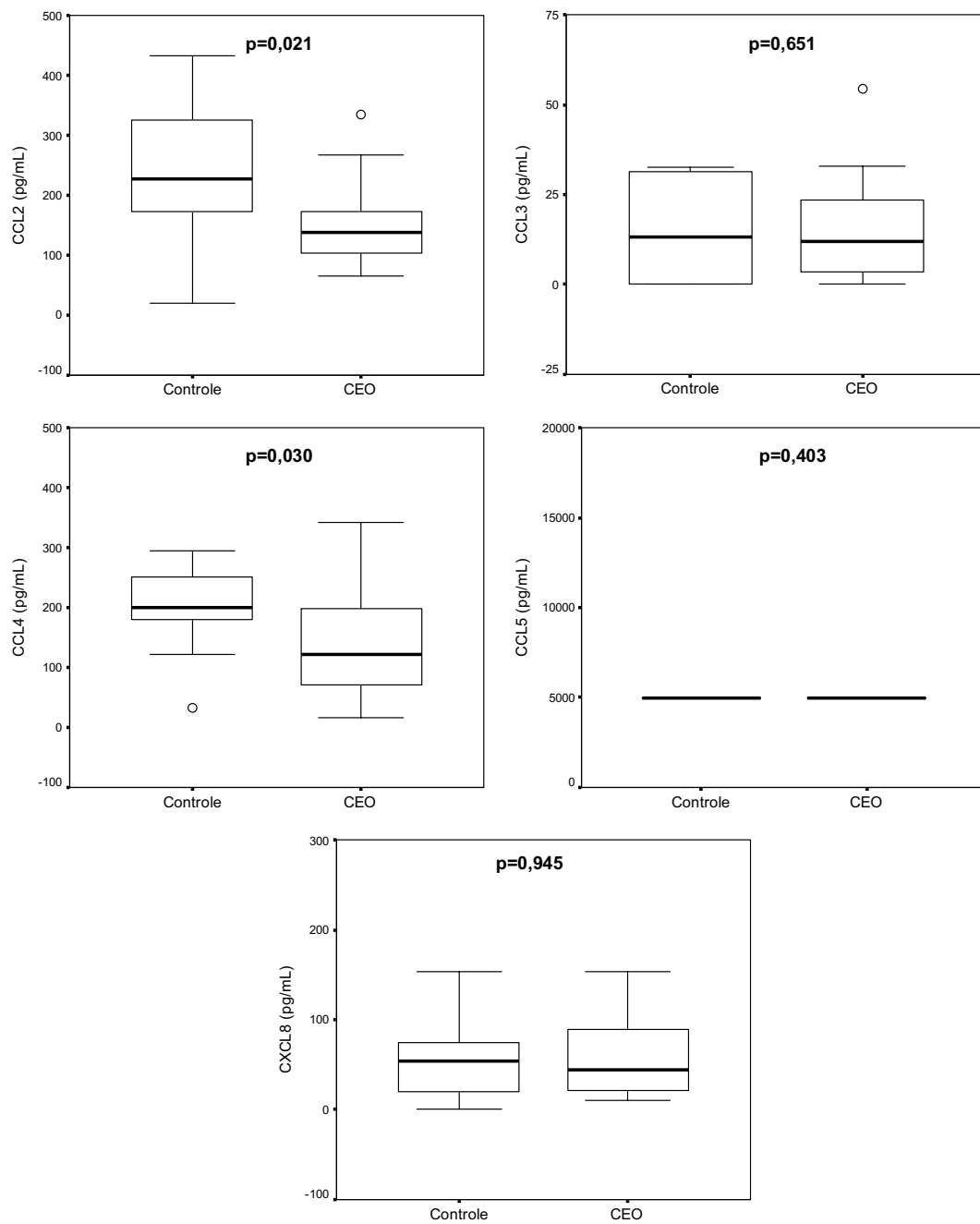
#### 4.1. Características gerais da amostra

As pacientes incluídas neste estudo apresentaram idade média  $\pm$  erro padrão da média de  $58,7 \pm 2,3$  anos, com variação entre 23 e 89 anos. Para a paridade a média foi de  $2,8 \pm 0,4$  partos com variação entre 0 e 8 partos. Não houve diferença significativa entre as pacientes com CEO e o grupo controle em relação à idade ( $54,9 \pm 3,8$  versus  $61,4 \pm 2,7$ ;  $p=0,161$ ) e paridade ( $2,3 \pm 0,5$  versus  $3,1 \pm 0,6$ ;  $p=0,324$ ). No grupo de pacientes com CEO, o estadiamento (FIGO) foi estadio I em 4 dos casos (25%), estadio III em 5 dos casos (31,3%) e estadio IV em 7 dos casos (43,8%). As dosagens de CA-125 obtidas nos exames pré-operatórios apresentaram valores médios de  $1308,3 \pm 671,6$  UI, com variação entre 17,7 e 7450,0 UI.

#### 4.2. Avaliação das quimiocinas, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8 nas pacientes com câncer epitelial de ovário e controles.

Conforme ilustra a figura 4.1 a dosagem sérica de CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 $\beta$  foi menor nas pacientes com CEO, em comparação ao grupo controle ( $p=0,021$  e  $p=0,031$ ; respectivamente). Não houve diferença entre os grupos na dosagem de CCL3/MIP-1 $\alpha$  ( $p=0,651$ ), CCL5/RANTES ( $p=0,403$ ) e CXCL8/IL-8 ( $p=0,945$ ) (Tabela 4.1).

---



Nota: CEO – câncer epitelial de ovário. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. As barras representam a variação entre o primeiro ( $P_{25}$ ) e o terceiro quartil ( $P_{75}$ ). A mediana é representada pela linha horizontal que divide as barras. Os pontos externos (*outlier*) estão rerepresentados pelos círculos.

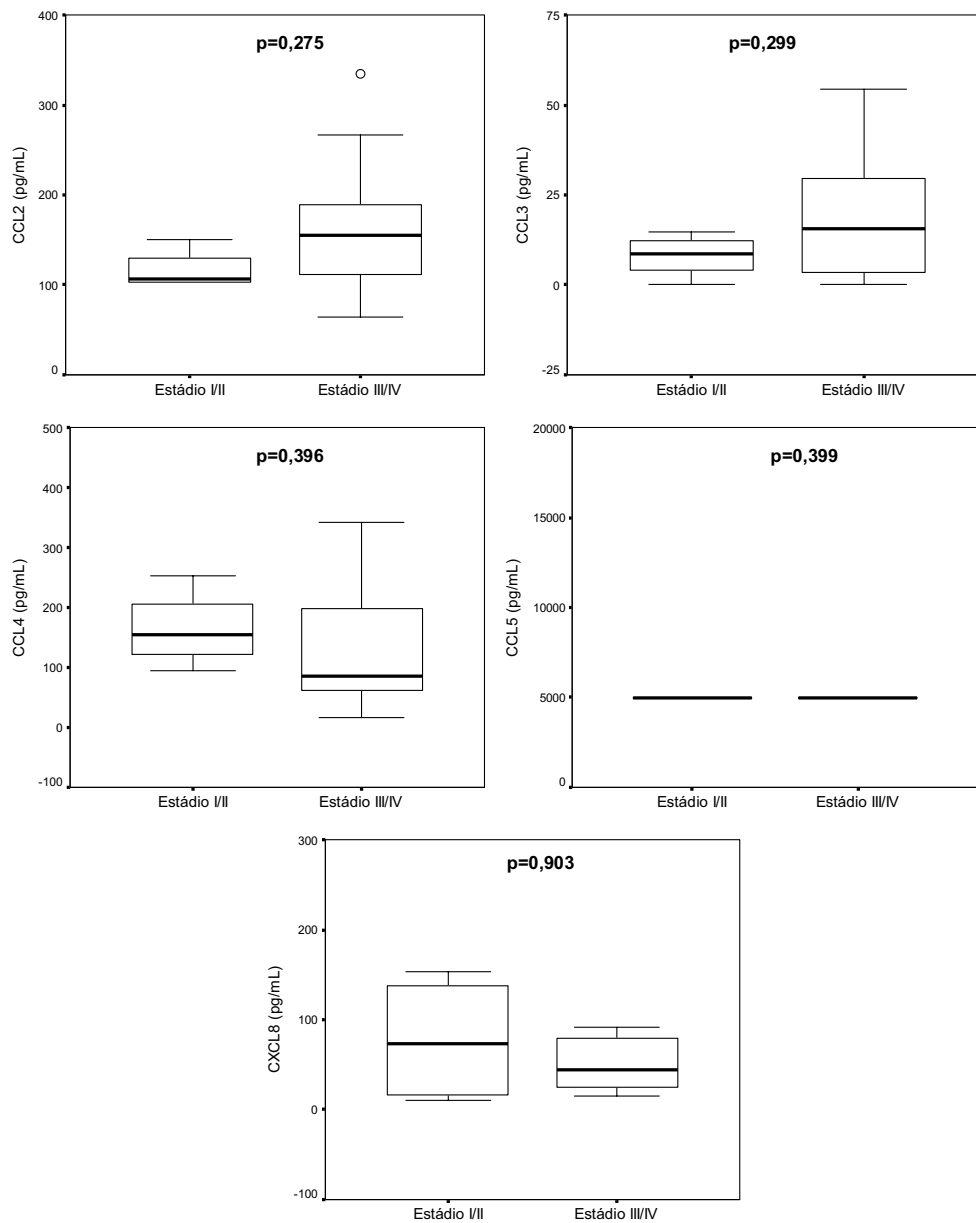
**Figura 4-1** - Comparação das dosagens séricas das quimiocinas , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em mulheres com câncer epitelial de ovário (n=16) com o grupo controle (n=18).

**Tabela 4-1:** Comparação das dosagens séricas das quimiocinas , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em mulheres com câncer epitelial de ovário (n=16) com o grupo controle (n=18)

Quimiocinas	Controles Mediana (intervalo interquartil)	CEO Mediana (intervalo interquartil)	p
CCL2/MCP-1 (pg/mL)	226,8 (159,4 - 335)	138 (103 – 172,8)	0,021
CCL3/ MIP-1 $\alpha$ (pg/mL)	13,1 (0 – 31,4)	11,9 (1,8 – 24,9)	0,651
CCL4/MIP-1 $\beta$ (pg/mL)	200 (174,5 – 262,2)	121,4 (71,1 – 241,8)	0,030
CCL5/RANTES (pg/mL)	5000 (5000 – 5000)	5000 (5000 – 5000)	0,403
CXCL8/IL-8 (pg/mL)	54,1 (19,7 – 81,1)	43,8 (20,6 – 90)	0,945

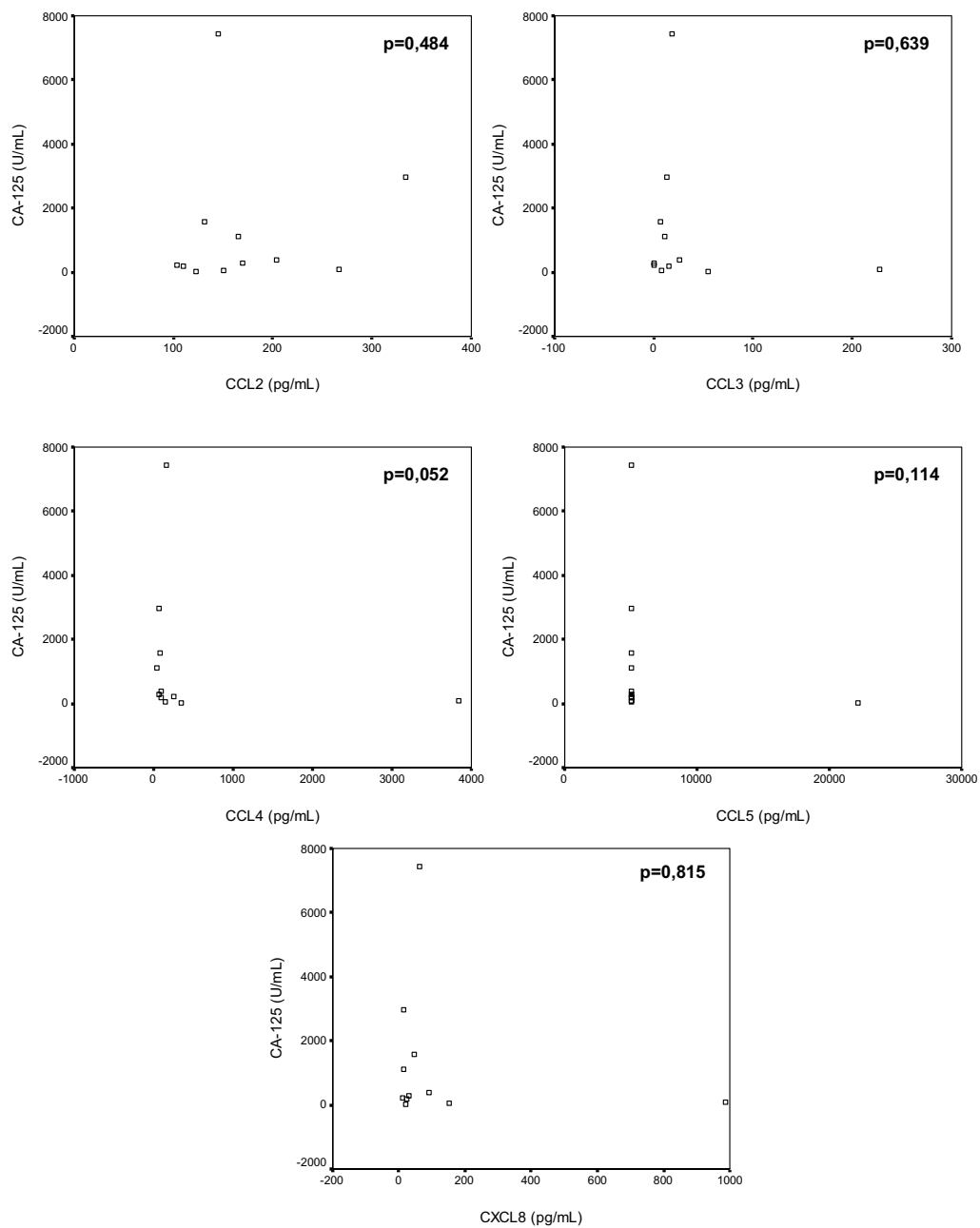
Nota: CEO – câncer epitelial de ovário. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os valores representam a mediana e intervalo interquartil (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>).

O estadiamento do tumor não se correlacionou com a dosagem sérica das quimiocinas CCL2/MCP-1 ( $p=0,275$ ), CCL3/MIP-1 $\alpha$  ( $p=0,399$ ), CCL4/MIP-1 $\beta$  ( $p=0,396$ ), CCL5/RANTES ( $p=0,399$ ) e CXCL8/IL-8 ( $p=0,903$ ) em mulheres com CEO (Figura 4-2). Também não houve correlação dos níveis séricos do CA-125 com as dosagens das quimiocinas CCL2/MCP-1 ( $\tau=0,164$ ;  $p=0,484$ ), CCL3/MIP-1 $\alpha$  ( $\tau=-0,110$ ;  $p=0,639$ ), CCL4/MIP-1 $\beta$  ( $\tau=-0,455$ ;  $p=0,052$ ), CCL5/RANTES ( $\tau=-0,426$ ;  $p=0,114$ ) e CXCL 8/IL-8 ( $\tau=-0,055$ ;  $p=0,815$ ) (Figura 4-3).



Nota: FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia. O estadiamento foi realizado de acordo com a FIGO, e para efeito de comparação foram agrupados os estádios I/II e III/IV. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. As barras representam a variação entre o primeiro ( $P_{25}$ ) e o terceiro quartil ( $P_{75}$ ). A mediana é representada pela linha horizontal que divide as barras. Os pontos externos (*outlier*) estão reaperentados pelos círculos.

**Figura 4-2** - Avaliação das dosagens séricas das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em mulheres com câncer epitelial de ovário (n=16) de acordo com o estadiamento (FIGO).



Nota: A correlação entre as variáveis foi feita pelo teste de *Kendall's tau*, sendo  $\tau=0,164$  (CCL 2),  $\tau=-0,110$  (CCL 3),  $\tau=-0,455$  (CCL 4),  $\tau=-0,426$  (CCL 5), e  $\tau=-0,055$  (CXCL 8).

**Figura 4-3** - Correlação dos níveis séricos do CA-125 com as dosagens das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em mulheres com câncer epitelial de ovário (n=16).



---

## *5. Discussão*

---



O câncer de ovário apresenta diagnóstico tardio e alta letalidade, justificando a busca de marcadores diagnósticos e prognósticos [2]. O estudo da resposta imune, pela sua importância nos processos de carcinogênese, representa uma linha de pesquisa com grande potencial em oncologia [10].

O presente estudo avaliou as quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em pacientes com CEO, visando caracterizar possíveis associações que permitissem a utilização destas como marcadores no câncer de ovário. A escolha dessas quimiocinas foi justificada pela possibilidade de avaliação do potencial migratório de leucócitos para os tecidos afetados durante o CEO [2, 14]. A associação do CEO com leucócitos e macrófagos já foi demonstrada anteriormente [34, 39, 43-45] e a atração e ativação destes agentes do sistema imune é intermediada pela ação das quimiocinas [14, 23].

### **5.1. Metodologia**

Para a dosagem das quimiocinas foi realizado o método de CBA em substituição à dosagem por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A maioria das técnicas para medidas de amostras solúveis utiliza tecnologia baseada no ensaio de ELISA [46]. A metodologia empregada neste estudo utiliza como princípio uma mescla da tecnologia baseada no ELISA com a citometria de fluxo, o que aumenta a sensibilidade de detecção dos analitos avaliados e agrega vantagens à sua utilização. O uso de esferas de

---

poliestireno marcadas com diferentes graus de intensidade como suporte para a reação de imunofluorescência permite a análise quantitativa de múltiplos parâmetros em uma única amostra; utilização de mínimos volumes de amostra para obtenção dos resultados; resultados e reprodutibilidade comparáveis com outras técnicas, como as baseadas na tecnologia ELISA; comparação direta com os ensaios já existentes e ainda avaliação mais rápida de múltiplas amostras em uma mesma plataforma [46-48].

Com o desenvolvimento da técnica, automatização de seus processos e a possibilidade de livre associação entre os parâmetros para estudo, a CBA ganha ainda mais em agilidade, ampliando sua possibilidade de inserção na abordagem clínica diária. Painéis de marcadores bioquímicos poderiam ser avaliados conjuntamente e seus achados utilizados como biomarcadores complexos para detecção de tumores iniciais ou melhor avaliação prognóstica de cada caso.

A presença de quimiocinas já foi demonstrada no líquido ascítico e soro de mulheres com câncer de ovário, apresentando uma grande diversidade de ações [49, 50] Esse estudo avaliou apenas a dosagem sérica das quimiocinas. A utilização do soro para a busca de marcadores tem como base sua reprodutibilidade e aplicabilidade facilitada, evitando que variações referentes ao método de coleta do líquido ascítico e mesmo a não obtenção deste material em alguns casos interferissem no resultado.

No entanto, para o melhor entendimento da resposta imune no CEO parece ser útil a avaliação em um mesmo estudo das quimiocinas no soro e no líquido ascítico. Fredman et al, 2008 demonstraram a presença dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR5 e CXCR4 em monócitos-macrófagos

---

CD4+ obtidos de líquido ascítico e sangue periférico de pacientes com CEO. Demonstraram que a presença de CCR1 é duas vezes maior nestas células obtidas no sangue e líquido ascítico de pacientes com CEO em relação aos monócitos-macrófagos normais e que a presença de CXCR4 é 3 vezes maior no líquido ascítico quando comparado às amostras de sangue normais e de pacientes com CEO. [35] A análise da dinâmica das repercussões imunológicas locais e sistêmicas poderia contribuir para elucidação até mesmo dos resultados conflitantes observados na literatura sobre a associação das quimiocinas no CEO.

Neste estudo, tivemos uma amostra de 16 pacientes no grupo casos e 18 no grupo controle, totalizando 34 pacientes, o que foi considerado adequado para o estudo. No entanto, um número maior de pacientes poderia permitir uma maior estratificação dos casos e facilitaria uma melhor análise da interação destes agentes do sistema imune com os diversos estádios da neoplasia. O CEO apresenta baixa prevalência, assim, amostras maiores em estudos multicêntricos podem representar a melhor abordagem.

## **5.2. Resposta imune no câncer de ovário**

A associação e interação da resposta imune e, em especial, a inflamação crônica, com a subsequente ativação de citocinas, fatores de crescimento, e quimiocinas, têm sido amplamente exploradas [51-56]. As quimiocinas CCL18, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1 $\alpha$  foram detectadas em níveis elevados no CEO [35, 57, 58]. Outros estudos

---

demonstraram aumento de CXCL8/IL-8 e diminuição de CCL2/MCP-1 [32, 59]. O presente estudo identificou todas as 5 quimiocinas estudadas, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8, em níveis detectáveis no soro, em ambos os grupos estudados.

As quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 $\beta$  apresentaram dosagens séricas menores nas mulheres com CEO, em comparação ao controle. A menor expressão de CCL2/MCP-1 no CEO já tinha sido encontrada por Penson et al [59] e Gorelik et al.[32]. Penson et al. avaliou, dentre outras quimiocinas e citocinas, a CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1, e sua relação com o tratamento com paclitaxel. Identificou um aumento consistente de CXCL8/IL-8 nas pacientes com câncer de ovário, diferentemente do observado para CCL2/MCP-1. Demonstrou ainda que com o tratamento com paclitaxel ocorreu um aumento da expressão de citocina IL 6 e das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8.

Gorelik et al avaliou pacientes que foram classificadas como portadoras de câncer de ovário em estágio inicial, pacientes hígdas e pacientes com tumores pélvicos benignos. Utilizando tecnologia denominada LabMAP, que também utiliza a associação dos princípios do imunoensaio com as técnicas de citometria de fluxo, avaliou 24 citocinas e demonstrou associação de seis destas proteínas com o CEO inicial, EGF(epidermal growth factor), MCP-1/CCL2, CA-125, VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-6, e IL-8/CXCL8. Estavam em menor concentração nas pacientes com CEO inicial apenas CCL2/MCP-1 e EGF, as demais apresentavam concentrações maiores nestas pacientes.

---

Esta menor concentração de CCL2/MCP-1 pode estar relacionada a um maior consumo desta molécula pelas células tumorais ovarianas. Estudos *in vitro* demonstraram a absorção de CCL2/MCP-1 nestas células, quando incubadas com plasma, o que poderia ser responsável por um seqüestro da molécula e uma diminuição de seus níveis circulantes [60, 61].

A quimiocina CCXL8/IL-8 também foi avaliada no estudo de Gorelik et al[32] sendo uma das variáveis que apresentou maior concentração no CEO em relação as paciente hígidas. A análise dos dados referentes a CXCL8/IL-8 realizada neste estudo não evidencia diferença entre o grupo de casos e o controle. Ressalta-se que a população de casos que avaliamos é, em sua maioria, composta por pacientes com CEO em estadio avançado, diferentemente do referido estudo que avaliou pacientes com CEO inicial. O impacto desta diferença pode ser relevante.

Da mesma forma, a presença e mesmo a transcrição do CCL4/MIP-1 $\beta$  já foi demonstrada em células do câncer epitelial do ovário [35]. Assim, mecanismo de consumo similar ao proposto para CCL2/MCP-1 pode também estar relacionado às menores concentrações desta molécula nas pacientes com câncer de ovário. No entanto, os tumores podem ter vários mecanismos para evitar a rejeição do organismo, bloqueando a ação do sistema imune, como perda de seus antígenos por mutação ou mesmo a produção de citocinas imunossupressoras. O carcinoma de ovário pode produzir a citocina imunossupressora IL10, que pode reduzir a expressão de quimiocinas, diminuindo a migração de determinados tipos celulares para o foco inflamatório [17].

---

A associação entre as quimiocinas e o estadiamento do tumor não foi demonstrada neste estudo. Na literatura, encontra-se a associação da expressão do receptor CXCR4 com maior agressividade e menor sobrevida global para o CEO [62]. Também a quimiocina CXCL12 associada ao receptor CXCR4 foi relacionada com pior prognóstico e a promoção da proliferação, migração e invasão das células do câncer de ovário [37, 62-66]. Estes achados, no entanto, não foram correlacionados com estadiamento. Não encontramos estudos que demonstrassem a correlação de outras quimiocinas com o estadiamento tumoral.

O mesmo foi observado para o CA125, que não se correlacionou com a dosagem das quimiocinas. Este achado já tinha sido demonstrado anteriormente [32] e pode ser um dado positivo, uma vez que a independência de marcadores pode permitir a utilização combinada destes para obtenção de uma informação complementar.

### **5.3. Considerações finais**

A dinâmica entre tumor e sistema imune mostra-se com grande espectro de variáveis. O conhecimento sobre o perfil de apresentação dos agentes deste sistema imune nas neoplasias é de grande importância para o melhor entendimento de todo o sistema imune e a resposta do organismo aos tumores.

O desenvolvimento de técnicas como CBA permite que se faça uma análise rápida e reprodutível de vários parâmetros, abrindo a perspectiva

---

de seu uso de forma mais abrangente. Novos estudos com maior número de pacientes, avaliando-se outros marcadores da resposta imune e outras vias desta resposta e, ainda, avaliando-se também a concentração de quimiocinas no líquido ascítico das pacientes acometidas, podem ajudar a definir os aspectos relacionados com tumor e hospedeiro.

Identificadas as quimiocinas relevantes no processo evolutivo do câncer de ovário, elas poderão contribuir na abordagem diagnóstica e na terapêutica desta neoplasia, que ainda representa grande desafio para a prática clínica oncológica moderna.

---



---

## *6. Conclusão*

---



O presente estudo permite concluir que a resposta imune pode estar associada ao estabelecimento e manutenção do CEO e o estudo das quimiocinas pode ser um mecanismo para esta avaliação.

- As quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL4/MIP-1 $\beta$ , apresentam menor dosagem sérica em mulheres com CEO comparadas ao grupo controle. Essa associação não foi evidenciada com as quimiocinas CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES e CXCL 8/IL-8.

- Não houve correlação/associação entre dosagens de quimiocinas com estadiamento tumoral ou o CA-125.

---



---

## *7. Referências Bibliográficas*

---

1. Silva-Filho, A.L., et al., *Cirurgia não Ginecológica em Pacientes com Câncer de Ovário*. RBGO, 2004. 26(5): p. 411-416.
  2. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(1): p. 10-30.
  3. Landis, S.H., et al., *Cancer statistics, 1999*. CA Cancer J Clin, 1999. 49(1): p. 8-31, 1.
  4. Edwards, B.K., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(19): p. 1407-27.
  5. Look, K., *Epidemiology, etiology, and screening of ovarian cancer*, in *Ovarian cancer* S.C. Rubin and G.P. Sutton, Editors. 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 167-180.
  6. Reis, F.M., et al., *Biochemical markers of ovarian cancer: diagnostic and prognostic value*. Italian Journal Of Gynaecology And Obstetrics, 2004. 16(3): p. 94-99.
  7. Brewer, M.A., et al., *Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia*. Clin Cancer Res, 2003. 9(1): p. 20-30.
  8. Ries, L.A., et al., *The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer*. Cancer, 2000. 88(10): p. 2398-424.
  9. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, *Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*. Cancer Cell, 2005. 7(3): p. 211-7.
-

10. Schottenfeld, D. and J. Beebe-Dimmer, *Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia*. CA Cancer J Clin, 2006. 56(2): p. 69-83.
  11. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 297-322.
  12. Svennevig, J.L. and H. Svaar, *Content and distribution of macrophages and lymphocytes in solid malignant human tumours*. Int J Cancer, 1979. 24(6): p. 754-8.
  13. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *How does the immune system distinguish self from nonself?* Semin Immunol, 2000. 12(3): p. 185-8; discussion 257-344.
  14. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. 1(3): p. 199-205.
  15. Andres, P.G., et al., *Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine*. J Immunol, 2000. 164(12): p. 6303-12.
  16. Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund, *Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence*. Curr Opin Microbiol, 1999. 2(1): p. 99-105.
  17. Janeway Jr, C.A., P. Travers, and M. Walport, *Imunidade Inata: Respostas inatas induzidas por infecção*, in *Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença* Artmed, Editor. 2007: Porto Alegre. p. 630-642.
-

18. Abbas, K.A., A.H. Lichtman, and J.S. Pober, *Imunologia Celular e Molecular*. 3 ed, ed. Revinter. 2000, Rio de Janeiro.
  19. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. 357(9255): p. 539-45.
  20. Mackay, C.R., *Chemokines: immunology's high impact factors*. Nat Immunol, 2001. 2(2): p. 95-101.
  21. Proudfoot, A.E., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(2): p. 106-15.
  22. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes*. Immunity, 2002. 16(1): p. 1-4.
  23. Matsukawa, A., et al., *Chemokines and innate immunity*. Rev Immunogenet, 2000. 2(3): p. 339-58.
  24. Scapini, P., et al., *The neutrophil as a cellular source of chemokines*. Immunol Rev, 2000. 177: p. 195-203.
  25. Luster, A.D., *The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(1): p. 129-35.
  26. Ono, S.J., et al., *Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(6): p. 1185-99; quiz 1200.
  27. Yoshie, O., *Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells*. Int J Hematol, 2000. 72(4): p. 399-407.
  28. Wong, M.M. and E.N. Fish, *Chemokines: attractive mediators of the immune response*. Semin Immunol, 2003. 15(1): p. 5-14.
-

29. O'Byrne, K.J. and A.G. Dalgleish, *Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy*. Br J Cancer, 2001. 85(4): p. 473-83.
  30. Koopman, L.A., et al., *Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer*. J Exp Med, 2000. 191(6): p. 961-76.
  31. Hagemann, T., et al., *Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype*. J Immunol, 2006. 176(8): p. 5023-32.
  32. Gorelik, E., et al., *Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. 14(4): p. 981-7.
  33. Wang, J.M., et al., *Chemokines and their role in tumor growth and metastasis*. J Immunol Methods, 1998. 220(1-2): p. 1-17.
  34. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(7): p. 540-50.
  35. Freedman, R.S., et al., *Migration deficit in monocyte-macrophages in human ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2007.
  36. Ben-Baruch, A., *The multifaceted roles of chemokines in malignancy*. Cancer Metastasis Rev, 2006. 25(3): p. 357-71.
  37. Kajiyama, H., et al., *Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma*. Int J Cancer, 2008. 122(1): p. 91-9.
-

38. Wang, X., et al., *Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease*. J Transl Med, 2006. 4: p. 30.
  39. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. 23(11): p. 549-55.
  40. Colombo, M.P. and A. Mantovani, *Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion*. Cancer Res, 2005. 65(20): p. 9113-6.
  41. DiSaia, P.J. and W.T. Creasman, *Epithelial ovarian cancer*, in *Clinical Gynecologic Oncology* M.M. Company, Editor. 2002: St. Louis. p. 289-350.
  42. Chen, R., et al., *Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology*. Clin Chem, 1999. 45(9): p. 1693-1694.
  43. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. J Pathol, 2002. 196(3): p. 254-65.
  44. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(1): p. 71-8.
  45. Lewis, C. and C. Murdoch, *Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies*. Am J Pathol, 2005. 167(3): p. 627-35.
  46. Morgan, E., et al., *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol, 2004. 110(3): p. 252-66.
-

47. Pierangeli, S.S., L.K. Silva, and E.N. Harris, *A flow cytometric assay for the detection of antiphospholipid antibodies*. *Am Clin Lab*, 1999. 18(6): p. 18-9.
  48. Lund-Johansen, F., et al., *Flow cytometric analysis of immunoprecipitates: high-throughput analysis of protein phosphorylation and protein-protein interactions*. *Cytometry*, 2000. 39(4): p. 250-9.
  49. Kryczek, I., et al., *CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers*. *Cancer Res*, 2005. 65(2): p. 465-72.
  50. Milliken, D., et al., *Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites*. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4): p. 1108-14.
  51. De Marzo, A.M., et al., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(4): p. 256-69.
  52. Marks, F., G. Furstenberger, and K. Muller-Decker, *Tumor promotion as a target of cancer prevention*. *Recent Results Cancer Res*, 2007. 174: p. 37-47.
  53. Chen, R., et al., *Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway*. *Am J Reprod Immunol*, 2007. 57(2): p. 93-107.
  54. Dinarello, C.A., *The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(3): p. 307-13.
  55. Zaenker, K.S., *Infection, inflammation and neoplasia: an interdisciplinary challenge*. *Contrib Microbiol*, 2006. 13: p. 232-9.
-



56. Smyth, M.J., et al., *Cytokines in cancer immunity and immunotherapy*. Immunol Rev, 2004. 202: p. 275-93.
  57. Schutysse, E., et al., *Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma*. J Biol Chem, 2002. 277(27): p. 24584-93.
  58. Negus, R.P., et al., *The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer*. J Clin Invest, 1995. 95(5): p. 2391-6.
  59. Penson, R.T., et al., *Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel*. Int J Gynecol Cancer, 2000. 10(1): p. 33-41.
  60. Pack, S.D., et al., *Simultaneous suppression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 reverses aneuploidy and malignant phenotype of a human ovarian carcinoma cell line*. Cancer Res, 2004. 64(3): p. 789-94.
  61. Gorelik, E., et al., *IL-12 receptor-mediated upregulation of FasL in human ovarian carcinoma cells*. Int J Cancer, 2004. 112(4): p. 620-7.
  62. Jiang, Y.P., et al., *Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer*. Chin Med J (Engl), 2007. 120(14): p. 1251-5.
  63. Kulbe, H., et al., *The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2005. 65(22): p. 10355-62.
-

64. Kulbe, H., et al., *The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(2): p. 585-92.
65. Scotton, C.J., et al., *Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?* *Cancer Res*, 2001. **61**(13): p. 4961-5.
66. Scotton, C.J., et al., *Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(20): p. 5930-8.
-



---

8. *Anexas*

---

## I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Mater Dei (CEP)



Belo Horizonte, 10 de junho de 2008.

A/C Dr. João Oscar de Almeida Falcão Júnior  
Investigador Principal

Prezado Dr. João Oscar,

Comunicamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei, analisou em reunião ocorrida dia 28 de novembro de 2007 e APROVOU o protocolo de pesquisa intitulado: "**Avaliação de quimiocinas séricas em mulheres com câncer epitelial de ovário**", a ser realizado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Mater Dei, sob sua responsabilidade.

As recomendações sugeridas por este Comitê foram atendidas em 06 de junho de 2008.

OBS: conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 – Operacionalização, cabê ao pesquisador:

- 1) Elaborar e apresentar os relatórios parcial e final da pesquisa;
- 2) Apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento;
- 3) Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

*Modelo de relatório parcial e final da pesquisa, disponível no site do Hospital Mater Dei:*

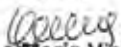
[www.materdei.com.br](http://www.materdei.com.br)

*Programação e Eventos*

*Atualização Médica*

*Comitê de Ética em Pesquisa.*

Cordialmente,

  
Cleusa Maria Vieira Miguel  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei

4

Comitê de Ética em Pesquisa  
do Hospital Mater Dei

## II. Consentimento Livre e Esclarecido

<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> <b>ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO E OVÁRIO</b>
---

### 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. DESCRIBÇÃO 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. DESCRIBÇÃO 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. João Oscar de Almeida Falcão Júnior  
Endereço: R. Ouro Preto 1463/01- Santo Agostinho. Belo Horizonte. Minas Gerais. CEP: 30 170 041. Tel: (31) 32913674 / 88737960

**CEP/HOSPITAL MATER DEI:** \_\_\_\_\_

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

---

**III. Estadiamento do câncer epitelial do ovário (FIGO )** (Cancer of the ovary. In: Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. FIGO 2003, p93-118)

**ESTÁDIO I: RESTRITO A OVÁRIOS**

Ia Tumor restrito a um ovário

Ib Tumor restrito a ambos ovários

Ic Citologia peritoneal positiva (células neoplásicas), implante ou cápsula rota

**ESTÁDIO II: EXTENSÃO PARA ÓRGÃOS PÉLVICOS**

Ila Tumor acomete trompas e/ou útero

Ilb Extensão a outros órgãos pélvicos

Ilc Citologia peritoneal positiva para células neoplásicas e 2a ou 2b

**ESTÁDIO III: EXTENSÃO PARA ALÉM DA PELVE OU LINFONODOS**

IIIa Metástase peritoneal microscópica além da pelve

IIIb Metástase peritoneal macroscópica de até 2cm além da pelve

IIIc Metástase peritoneal maior de 2cm e/ou em linfonodos regionais

**ESTÁDIO IV: METÁSTASE A DISTÂNCIA ALÉM DA CAVIDADE PERITONEAL**

---



---

## 9. Summary

---



**Introduction:** The dynamics of the host immune system enables defense against pathogenic agents and neoplastic cells through a wide range of mechanisms. Because chemokines are responsible for modulating the immune response in leukocyte migration processes to epithelial ovarian cancer (EOC)-affected tissues, we aimed to investigate CCL2/MCP-1, CCL3/ MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES and CXCL 8/IL-8 in women with EOC. **Methods:** Sixteen patients diagnosed with EOC and 18 healthy women with no evidence of malign neoplasia (control group) aged from 23 to 89 years (mean $\pm$ SEM: 58.7 $\pm$ 2.3 years) were included. The EOC patients underwent laparotomy and debulking surgery. Chemokines dosage assays were made using Cytometric bead array (CBA). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney and Kendall's tau, and  $p < 0.05$  was regarded as significant. **Results:** The tumor staging (FIGO) was classified into: I in 4 cases (25%), III in 5 cases (31.3%) and stage IV in 7 cases (43.8%). Sera chemokine dosage of CCL2/MCP-1 and CCL4/MIP-1 $\beta$  were lower in EOC patients compared to the control group ( $p = 0,021$  and  $p = 0,031$ ; respectively). No significant difference was observed in the levels of CCL3/ MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES and CXCL 8/IL-8 between groups. No association between the chemokines analyzed and the epithelial ovarian cancer staging was found, and CA125 was not correlated with chemokine dosage. **Conclusion:** The establishment of epithelial ovarian cancer may be correlated with the host immune response dynamics, and the study of chemokines could be regarded as a valid diagnostic tool for evaluating the extent of the disease.

---