

**Sálua Oliveira Calil de Paula**

---

---

**Caracterização da Resposta Imune Celular em  
Mulheres com Câncer de Ovário**

---

---

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

**Orientador: Professor Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho  
Co-orientadora: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho**

Botucatu / São Paulo  
2010

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*

Paula, Sálua Oliveira Calil de.

Caracterização da resposta imune celular em mulheres com câncer de ovário  
/ Sálua Oliveira Calil de Paula. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho  
Co-orientador: Andréa Teixeira de Carvalho  
Assunto CAPES: 40101150

1. Ginecologia 2. Ovários - Câncer

Palavras-chave: Câncer de ovário; Células; Monócitos; Neoplasia benigna de ovário; Neutrófilos; Resposta imune;

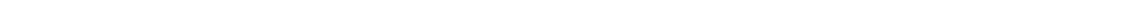
*Dedicatória*

---

---

## **D**EDICO ESTA TESE...

Ao meu pai,  
grande amigo e meu exemplo profissional.



*Agradecimientos*

---

Ao doutor Agnaldo Lopes da Silva Filho, exemplo de competência, não só pela orientação, mas também pela sua confiança e amizade. Pelo privilégio de poder compartilhar de sua sabedoria e humildade.

A Dra Andréa Teixeira de Carvalho, grande exemplo de pesquisadora comprometida com a fidedignidade do seu trabalho.

Aos profissionais do laboratório de Biomarcadores do Centro de Pesquisas René Rachou, indispensáveis na realização deste estudo.

Aos amigos do hospital Mário Penna, em especial: Dra. Telma, Dr. Délzio, Dra. Márcia Prado, Dra. Márcia Maia, Dra Iracema e Dr. Geraldo, pelo grande auxílio na coleta de material.

Aos amigos do Hospital Mater Dei pela rica convivência e incentivo ao crescimento profissional e pessoal.

Ao meu eterno preceptor José Helvécio, com sua inteligência admirável, sempre disposto em me ajudar.

Aos amigos Gustavo e Elisa, irmãos de coração, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos professores da Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, em especial ao Professor Paulo Traiman e Professor Adriano, pelos ensinamentos e atenção.

Aos colaboradores do Setor de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, Regina, Nathanael, Janete e Ana Cláudia, pela disponibilidade e ajuda.

---

Aos meus avós, tios, primos, e amigos, obrigada pelo carinho.

Aos meus irmãos, Thales e Grimaldo, por estarem presentes em todos os momentos, torcendo pelo meu sucesso.

Em especial aos meus pais, por dedicarem suas vidas à minha formação intelectual e moral.

---

*Epigrafe*

---



“Toda reforma interior e toda mudança para melhor dependem exclusivamente da aplicação do nosso próprio esforço.”

*Immanuel Kant*

---

*Índice*

---

---

**Siglas****Resumo**

<b>1. Introdução.....</b>	<b>18</b>
1.1 Câncer de Ovário.....	19
1.2 Resposta imune .....	20
1.2.1 Características das células imunológicas da resposta inata .....	21
1.3 Resposta imune tumoral.....	22
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
<b>3. Casuística e Métodos.....</b>	<b>26</b>
3.1 Casuística.....	27
3.1.1. Critérios de inclusão .....	28
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Análise por Citometria de Fluxo .....	29
3.2 Métodos.....	36
3.2.1 Aspectos Éticos e Legais .....	36
3.2.2 Análise Estatística .....	36
<b>4. Resultados.....</b>	<b>37</b>
4.1 Características gerais da amostra.....	38
4.2. Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	38
4.3 Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem de moléculas de ativação por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	39
4.4 Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem de moléculas de adesão celular por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	41
4.5 Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem de receptores de quimiocinas (CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 e CXCR4) por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	42
4.6 Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem da molécula de ativação HLA-DR e intensidade média de fluorescência da molécula de ativação HLA-DR por monócitos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	44

---

4.7 Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem das moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) e intensidade média de fluorescência da molécula de co-estimulação (CD86) por monócitos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	45
4.8 Análise <i>ex vivo</i> da porcentagem dos linfócitos NK (CD3-CD56+) e linfócitos NKT (CD3+CD56+) no sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.....	47
<b>5. Discussão .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>56</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>65</b>
I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital (CEP) .....	66
II. Consentimento livre e esclarecido.....	67
III. Estadiamento FIGO.....	68
<b>9. Summary .....</b>	<b>69</b>

---

*Siglas*

---

CD	Grupo de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMF	Citometria de Fluxo
EDTA-K3	ácido etileno-diamino tetracético
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
MFI	Intensidade média de fluorescência
mm	milímetro
NK	natural killer
nm	nanômetro
PE	Ficoeritrina
SSC	Side Scatter
TC	Tricolor
µL	Micro litro

---

*Resuma*

---

**Introdução:** O câncer de ovário apresenta diagnóstico tardio e alta letalidade, devido à falta de biomarcadores sensíveis e específicos e à rápida progressão desse câncer, assintomático em estádios iniciais. As células imunes têm a capacidade de eliminar as células malignas e regular a progressão tumoral. Contudo, as células imunes do microambiente tumoral são disfuncionais e falham no controle da expansão tumoral podendo, inclusive, promover o crescimento da neoplasia. Apesar das inúmeras tentativas de se correlacionar o grau e o tipo de infiltrado celular com o prognóstico ou sobrevida do paciente com câncer de ovário, não há consenso sobre o real significado do infiltrado leucocitário nesses casos. Desse modo, este estudo tem como objetivo a ampliação dos conhecimentos relativos à imunidade inata em mulheres com câncer de ovário, através caracterização dos aspectos fenotípicos celulares da imunidade inata sérica.

**Métodos:** Trata-se de estudo transversal onde foram avaliadas 36 mulheres submetidas a exame clínico, ginecológico, ultrassonografia transvaginal e tratamento com laparotomia nos casos indicados de massa pélvica. De acordo com o resultado desses exames, as mulheres selecionadas foram agrupadas nos grupos: controle- ausência de neoplasia, com neoplasia ovariana benigna e neoplasia ovariana maligna. Realizou-se dosagem sérica de moléculas de expressão de superfície de células da resposta imune inata com análise através da citometria de fluxo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney (dois grupos) ou Kruskal-Wallis (três grupos) conforme indicados. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

---



**Resultados:** Foram selecionadas 36 pacientes: 10 mulheres no grupo controle, 9 no grupo de neoplasia ovariana benigna e 17 no grupo de neoplasia maligna. Mais de 70% das pacientes com câncer de ovário apresentavam-se com doença avançada e valores de CA125 muito alterados. Em relação às análises avaliadas, observou-se alteração estatística entre os grupos para as moléculas de expressão em neutrófilos CD80, CD69, CD62L, CCR3 e CXCR4. Nas moléculas expressas pelos monócitos as diferenças encontradas foram na intensidade de fluorescência de HLA-DR e CD86 e na expressão de CD80. Não se observou diferença estatística nas análises das moléculas de superfície de células NK entre os grupos.

**Conclusão:** Os resultados desses experimentos mostraram as alterações fenotípicas das moléculas de superfície das células da resposta imune inata entre os grupos, o que auxilia na progressão da carcinogênese.

**Palavras chave:** câncer de ovário, neoplasia benigna de ovário, resposta imune, monócitos, neutrófilos, células NK

---

# *1. Introdução*

---

## 1.1 CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário é a principal causa de morte entre os tumores malignos ginecológicos nos Estados Unidos, sendo o oitavo em incidência e o quinto maior causador de morte entre mulheres com câncer, excluindo aqueles de pele por tumor não melanoma. Para 2009, a Sociedade Americana de Câncer estimou 21.550 casos novos e 14.600 mortes por câncer de ovário. Nos últimos 25 anos, a sobrevida em cinco anos teve modesta melhora de 37% no início da década de 1970 para 44% no ano 2000. Entre os anos de 2001 a 2005, a incidência do câncer de ovário reduziu à taxa de 2,4% ao ano [1]. No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer de 2009, a estimativa foi de 3837 novos casos de câncer de ovário, sendo que em 2007, o número de mortes por essa neoplasia foi de 2583 [2].

O câncer de ovário é o câncer ginecológico mais difícil de ser diagnosticado por ser assintomático nos estádios iniciais. Desse modo, cerca de 3/4 dos tumores malignos de ovário apresentam-se em estadios avançados quando do diagnóstico inicial. A etiologia dessa neoplasia é pouco conhecida e o caráter hereditário está presente em 10% de todos os casos [3, 4].

O tratamento padrão para o câncer de ovário é a citorredução cirúrgica seguida por quimioterapia com agentes derivados da platina (carboplatina ou cisplatina) associados aos taxanes (paclitaxel ou docitaxel) [5, 6]. A maioria dos carcinomas de ovário é sensível a esse regime terapêutico, porém 20 a 30% das pacientes são resistentes. Isso reflete uma sobrevida em 5 anos menor

---

que 20% nas mulheres com estágio III e IV da FIGO [7]. Além disso, 60 a 70% das mulheres apresentam recorrência em 2 a 5 anos, com conseqüente óbito. Apesar dessa alta taxa de recorrência, 20 a 30% das pacientes não apresentam recidiva ou experimentam um período prolongado de sobrevida livre de doença [6].

O tratamento efetivo para a doença recorrente ou metastática ainda não é uma realidade, demonstrando a importância da busca de novas estratégias terapêuticas para o câncer de ovário.

A detecção precoce poderia, teoricamente, melhorar a sobrevida. Entretanto, isso continua a ser um problema devido à raridade da doença na população em geral, à falta de biomarcadores sensíveis e específicos e à rápida progressão desse câncer, assintomático em estádios iniciais [8].

## 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, atua contra o agente agressor de maneira inespecífica e não aumenta com a repetida exposição à esse agente [9]. A imunidade adaptativa acentua mecanismos efetores similares àqueles da resposta inata, direcionando-os com maior precisão. Essa resposta é executada pelos fagócitos (polimorfonucleares, macrófagos e eosinófilos), basófilos, mastócitos, células citotóxicas naturais (células NK) e pelos sistemas proteolíticos de contato [10].

---

A resposta adaptativa pode ser determinada pela ativação de macrófagos ou pela produção de anticorpos. [11]. A definição de qual será a via dominante está associada à diferenciação das células CD4 virgens em células T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2 no tecido linfóide. As células T<sub>H</sub>1 estão associadas à ativação de macrófagos e as células T<sub>H</sub>2 a produção de anticorpos [12]. Os mecanismos que controlam esta diferenciação ainda não estão bem definidos. Sabe-se que as citocinas e quimiocinas presentes nos tecidos no início da fase de diferenciação tem grande influência nesse processo [13] Macrófagos e linfócitos ativados atuam de forma interativa na liberação de citocinas que amplificam essa resposta imune

### 1.2.1 CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DA RESPOSTA INATA

Os monócitos são células sanguíneas circulantes derivadas da medula óssea, precursores dos macrófagos teciduais. Essas células expressam a molécula de superfície CD14 responsável pela ligação ao complexo lipopolissacarídeo e pela ativação de macrófagos Os macrófagos exercem a fagocitose, são citotóxicos e atuam na produção de citocinas para o recrutamento e ativação de outras células inflamatórias [14-17].

Os neutrófilos atuam na sinalização e migração de células da resposta imune, e junto com os macrófagos compõem os principais fagócitos do organismo. Essas células expressam uma grande variedade de moléculas de superfície e

---

são os primeiros tipos celulares a responder à maioria dos agentes agressores [16].

As células NK são linfócitos que ativam fagócitos através da secreção de citocinas, além de serem citotóxicas quando estimuladas. Essas células contêm grânulos citoplasmáticos em abundância e expressam marcadores de superfície celular característicos, como CD3 / CD56, mas não expressam imunoglobulinas e receptores de células T, os receptores de antígenos dos linfócitos B e T respectivamente [10].

### 1.3 RESPOSTA IMUNE TUMORAL

Evidências mostram que o sistema imune do hospedeiro interage com o desenvolvimento tumoral e, em alguns casos, pode ser responsável pelo retardo do crescimento tumoral e da sua progressão. A presença de anticorpos contra antígenos tumorais, assim como células da resposta inata no sangue periférico e no sítio tumoral têm sido reportadas em certos casos. Isso aponta que as células imunes e os anticorpos são capazes de mediar a rejeição tumoral nesses pacientes. *In vitro*, células efectoras isoladas, incluindo linfócitos T, células NK e macrófagos têm mostrado serem efetivos contra tumores através de mecanismos como lise osmótica ou apoptose e citotoxicidade celular. *In vivo*, contudo, os tumores parecem desenvolver mecanismos de escape ao sistema imune. As células neoplásicas podem evadir à imunovigilância por diversas vias, sendo que a capacidade de interferir na

---

função das células imunes parece ser o principal motivo de falha no controle da progressão tumoral [18, 19].

Duas possibilidades têm sido consideradas para explicar a falha da imunidade na contenção tumoral. A primeira seria a de que a resposta imune ocorre tanto no sítio tumoral primário quanto sistemicamente, mas de forma inapropriada e distorcida. Outra explicação seria a reação imunológica específica contra o tumor que consegue evadir ao reconhecimento das células imunes. O papel do microambiente tumoral no reconhecimento e progressão do câncer tem sido cada vez mais estudado, e as interações entre as células imunes, as células tumorais e os componentes moleculares do tumor exercem influência significativa na progressão da doença [20]

Vários estudos [8, 18, 21-27] têm demonstrado a presença da resposta imune tumoral no momento do diagnóstico do câncer de ovário. Certos fatores imunológicos da resposta inata têm sido correlacionados com a sobrevivência dessas pacientes, o que sugere que o sistema imune desempenha um importante papel no controle da recorrência e da mortalidade. Os resultados desses experimentos têm revelado o enorme potencial do tratamento baseado na imunoterapia para a neoplasia ovariana. Desse modo, este estudo tem como objetivo a ampliação dos conhecimentos relativos à imunidade inata em mulheres com câncer de ovário, para que possíveis estratégias terapêuticas sejam criadas em um futuro próximo.

---

## 2. *Objetiva*

---



## 2.1. Objetivo geral

- ▶ Caracterizar os aspectos fenotípicos celulares da imunidade inata sérica em mulheres com câncer de ovário

## 2.2. Objetivos específicos

- ▶ Comparar no contexto *ex-vivo* as populações de neutrófilos entre mulheres saudáveis (controle), com neoplasia benigna e maligna de ovário
  - ▶ Comparar no contexto *ex-vivo* as populações de monócitos entre mulheres saudáveis (controle), com neoplasia benigna e maligna de ovário
  - ▶ Comparar no contexto *ex-vivo* as populações de células NK entre mulheres saudáveis (controle), com neoplasia benigna e maligna de ovário
-

### *3. Casuística e Métodos*

---

### **3.1 Casuística**

Trata-se de estudo transversal onde foram avaliadas 36 mulheres atendidas nos ambulatórios de ginecologia e de oncologia ginecológica do Hospital das Clínicas da UFMG e no Hospital Mário Penna no período de setembro de 2008 a setembro de 2009. Essas mulheres procuraram os ambulatórios para realização de exame ginecológico de rotina (colpocitologia oncológica) ou foram encaminhadas para realização de propedêutica de massa pélvica. Todas as pacientes foram submetidas a exame clínico, ginecológico, ultrassonografia transvaginal.

O tratamento com laparotomia foi indicado para aquelas mulheres que apresentavam massa pélvica com indicação de ressecção cirúrgica e as peças cirúrgicas foram avaliadas pelo serviço de anatomia patológica de referência de cada hospital. As pacientes selecionadas foram agrupadas em 3 grupos de acordo com os achados ultrassonográficos e exame anatomopatológico da peça cirúrgica: controle (sem evidência de massa pélvica ao ultrassom), neoplasia ovariana benigna (cistadenoma seroso de ovário) e neoplasia ovariana maligna (cistoadenocarcinoma de ovário).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o parecer de nº. ETIC 326/08 (anexo I).

---

### **3.1.1 - Critérios de Inclusão**

- ✓ Mulheres com diagnóstico de cistoadenocarcinoma seroso de ovário submetidas a tratamento cirúrgico
  - ✓ Mulheres com diagnóstico de cistadenoma de ovário submetidas a tratamento cirúrgico
  - ✓ Mulheres sem evidências de doenças ginecológicas ou neoplasias malignas
  - ✓ Ausência de processo infeccioso agudo peritoneal evidente à laparotomia.
  - ✓ Pacientes sem tratamento prévio por quimioterapia e/ou radioterapia.
  - ✓ Não utilização de imunossupressores, corticosteróides e/ou antiinflamatórios não esteróides há pelo menos 3 meses.
  - ✓ Termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
-

---

### 3.2 Métodos

No presente estudo, foram analisadas amostras de sangue periférico, obtidas através de punção venosa, utilizando anticoagulante EDTA-K3 (ácido etileno-diamino tetracético) 1,5 +/- 0,15 mg/mL preparadas por técnica de marcação direta e “lyse/wash”. A análise dessas amostras foi obtida por citometria de fluxo (CMF) realizada através da utilização de 5 parâmetros: tamanho celular (FSC), complexidade interna (SSC) e três fluorescências: FITC, PE e TC.

O painel de anticorpos monoclonais incluiu os seguintes marcadores: CD3, CD14, CD16, CD18, CD19, CD23, CD25, CD54, CD56, CD62L, CD69, CD80, CD86, CCR2, CCR5, CCR3, CXCR3, CXCR4, HLA-DR e controle isotópico. Todos os resultados de imunofenotipagem encontram-se armazenados no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou.

#### 3.2.1 Análise por Citometria de Fluxo – Protocolo de imunofenotipagem celular

As amostras de sangue periférico foram coletadas no per operatório, antes da indução anestésica, em tubos a vácuo de 5mL, contendo anticoagulante EDTA-K3 (Vacutainer – Becton Dickinson –BD, E.U.A.), para a realização dos ensaios no contexto *ex vivo* de imunofenotipagem dos linfócitos. Logo após a coleta do sangue, os tubos foram invertidos 4 a 6 vezes para a homogeneização, e armazenados em temperatura ambiente (20 a 25°C).

---

---

Foram adicionados 2 $\mu$ L do anticorpo monoclonal específico, em tubos de poliestireno 12x75mm, para o marcador de superfície celular de interesse marcado com fluorocromo (Tabela 1). Combinações específicas de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos distintos (Isoticianato de fluoresceína - FITC; Ficoeritrina - PE; Cychrome - CYCHR; Tricolor - TC) foram utilizadas para a análise simultânea de marcadores de superfície celular necessários para a caracterização de subpopulações celulares de interesse. Para cada combinação de anticorpo monoclonal, foram adicionadas alíquotas de 50 $\mu$ L de sangue periférico. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise comercial (FACS® Lysing Solution – Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1300rpm, 7 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 2mL de PBS (0,015M pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Ao final, os leucócitos foram fixados com 200 $\mu$ L de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de 15 minutos a 4°C, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram expressos no citômetro de fluxo (FACSscalibur® – Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise

---

dos resultados foi empregado o programa FlowJo versão 7.5.5 para Windows XP (©Tree Star, Inc. 2009) associando diferentes estratégias (Figura 1).

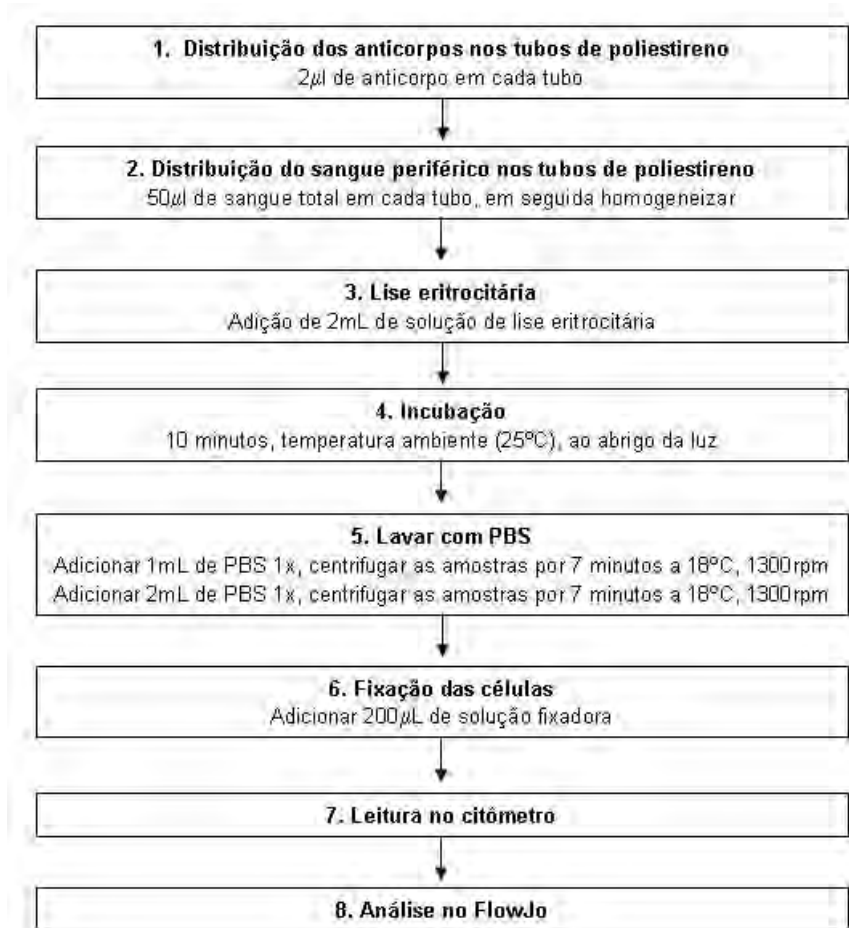


Figura 1: Fluxograma do protocolo básico de imunofenotipagem para detecção das células do sangue periférico marcadas com as combinações específicas de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpo	Fluocr.*	[ ]**	Fenótipo alvo no estudo
Anti-IgG1	FITC	0,5 µg	Controle isotópico
Anti-IgG1	PE	0,5 µg	Controle isotópico
Anti-IgG1	PerCP	0,5 µg	Controle isotópico
Anti-IgG2a	PE	0,5 µg	Controle isotópico
Anti-CCR2	FITC	0,5 µg	Migração de linfócitos T, monócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas. Liga-se a CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL12 (MCP-5), CCL13 (MCP-4), CCL16 (HCC-4).
Anti-CCR3	FITC	0,5 µg	Migração de eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T. Liga-se a CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-

			2), CCL11 (EOTAXINA).
Anti-CCR5	FITC	0,5 µg	Migração de linfócitos T (TH1>TH2), célula NK, monócito/macrófago, basófilo, célula dendrítica imatura, célula de medula óssea T Liga-se a CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2), CCL11 (EOTAXINA), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1).
Anti-CD18	PE	0,5 µg	Molécula de adesão celular expressa em leucócitos.
Anti-CD19	TC	0,5 µg	Ativação das células B
Anti-CD23	PE	0,5 µg	Molécula de ativação celular, receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRII). Células B maduras, macrófagos ativados, eosinófilos
Anti-CD25	PE	0,5 µg	Ativação de leucócitos, identificação de células T reguladoras.
Anti-CD3	TC	0,5 µg	Associado ao receptor de células T (TCR). Exigido para expressão na superfície celular e para transdução de sinal pelo TCR. Expresso em timócitos e linfócitos T.
Anti-CD14	FITC	0,5 µg	Liga-se ao complexo de lipopolissacáride, necessário para ativação do macrófago
Anti-CD16a	PE	0,5 µg	Células NK e macrófagos. Ativação de células NK e ADCC
Anti-CD16b	PE	0,5 µg	Neutrófilos. Ativação de neutrófilo
Anti-CD54	PE	0,5 µg	Molécula de adesão de leucócitos. Liga-se à CD11a/CD18. Células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas
Anti-CD62L	PE	0,5 µg	Molécula de adesão celular expressa em leucócitos. Células B e T, monócitos, células NK
Anti-CD69	PE	0,5 µg	Molécula de ativação de leucócitos: células T e B ativadas, macrófagos ativados, células NK.
Anti-CD80	PE	0,5 µg	Células dendríticas, células B ativadas e macrófagos. Co-estimulador para ativação de linfócitos T
Anti-CD86	PE	0,5 µg	Células B, monócitos, células dendríticas e algumas células T. Co-estimulador para ativação do linfócito T.
Anti-CD56	TC	0,5 µg	Células NK, alguns tipos de células T e B. Adesão homotípica
Anti-CXCR4	FITC	0,5 µg	Célula de medula óssea CD34+, linfócito progenitor, célula T, célula dendrítica, célula B, célula plasmática, célula T CD4 ativada
Anti-HLA-DR	PE	0,5 µg	Molécula de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas. Linfócito T ativado, monócito pró-inflamatório
Anti-CXCR3	FITC	0,5 µg	Migração de fibroblastos e linfócitos T ativados (TH1>TH2). Liga-se a CXCL4 (PF4), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC).

**Fonte:** CD Reference Chart. 8th HLDA International Workshop, 2004. MASON *et al.*, 2003; D'AMBROSIO *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2003.

FITC = isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; TC = tricolor

\* Fluocr. = Fluocromo

\*\*[ ] = Concentração

A aquisição dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur™, programa CellQuest, equipado com um laser de argônio de 488nm e outro de



625nm. Pela análise gráfica de tamanho e complexidade interna, avaliou-se a população leucocitária total, como demonstrado na figura 2, onde Linf corresponde à população de linfócitos, Mon corresponde à população de monócitos e Gran à de granulócitos.

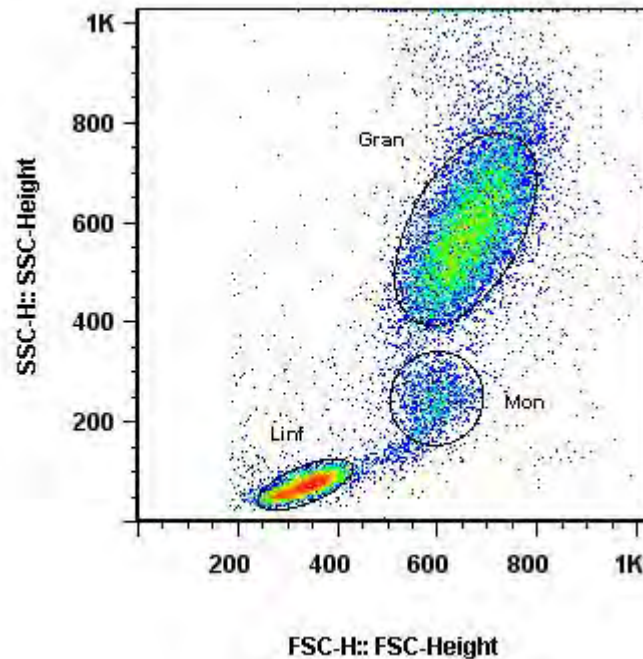


Figura 2. Distribuição gráfica das populações celulares segundo os parâmetros de tamanho (FSC - Forward Scatter) e de complexidade interna das células (SSC - Side Scatter) onde Linf corresponde à população de linfócitos, Mon corresponde à população de monócitos e Gran corresponde à população de granulócitos.

As populações de interesse (linfócitos NK, monócitos e neutrófilos) foram selecionadas sob a forma de “gate” como mostrado na figura 3, e analisadas nos gráficos do tipo “dot plot” e/ou “pseudocolor”, procurando-se correlacionar todas as fluorescências entre si. Esta análise possibilitou o maior número possível de informações para cada marcador imunofenotípico, como exemplificado nas figuras 4 e 5, onde foram obtidos resultados em números percentuais para cada marcador imunofenotípico correspondente à localização

das populações devidamente marcadas nos quadrantes dos gráficos do tipo “pseudocolor”. Estes valores percentuais foram obtidos de tabelas de análise estatística para os respectivos quadrantes através do programa FlowJo.

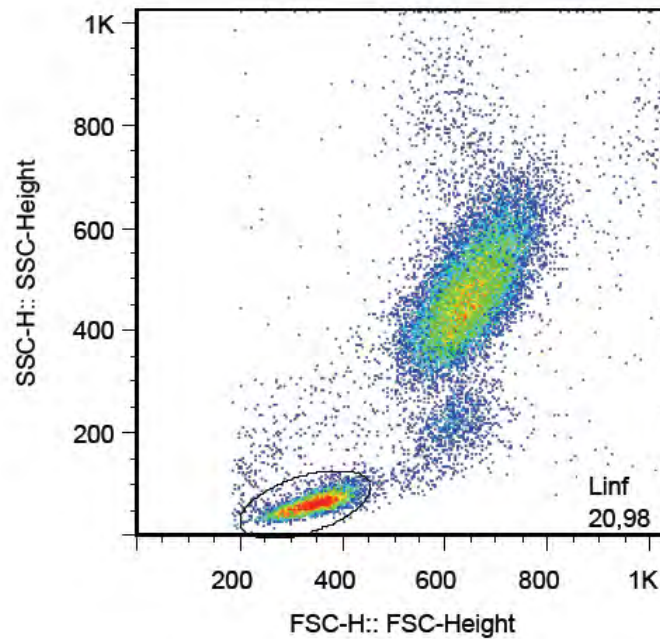


Figura 3. Distribuição gráfica das populações celulares segundo os parâmetros de tamanho (FSC - Forward Scatter) e de complexidade interna das células (SSC - Side Scatter) mostrando no local circulado a população de linfócitos selecionada sob a forma de “gate”.

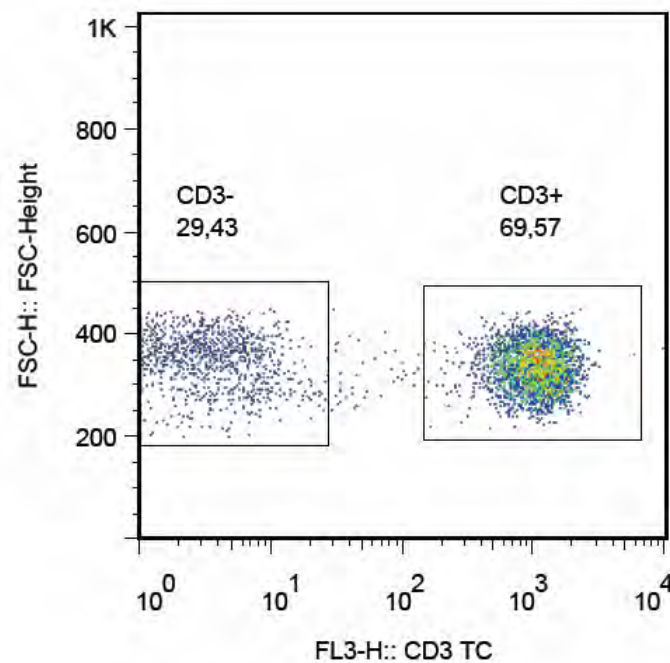


Figura 4: Distribuição gráfica das subpopulações linfócitos

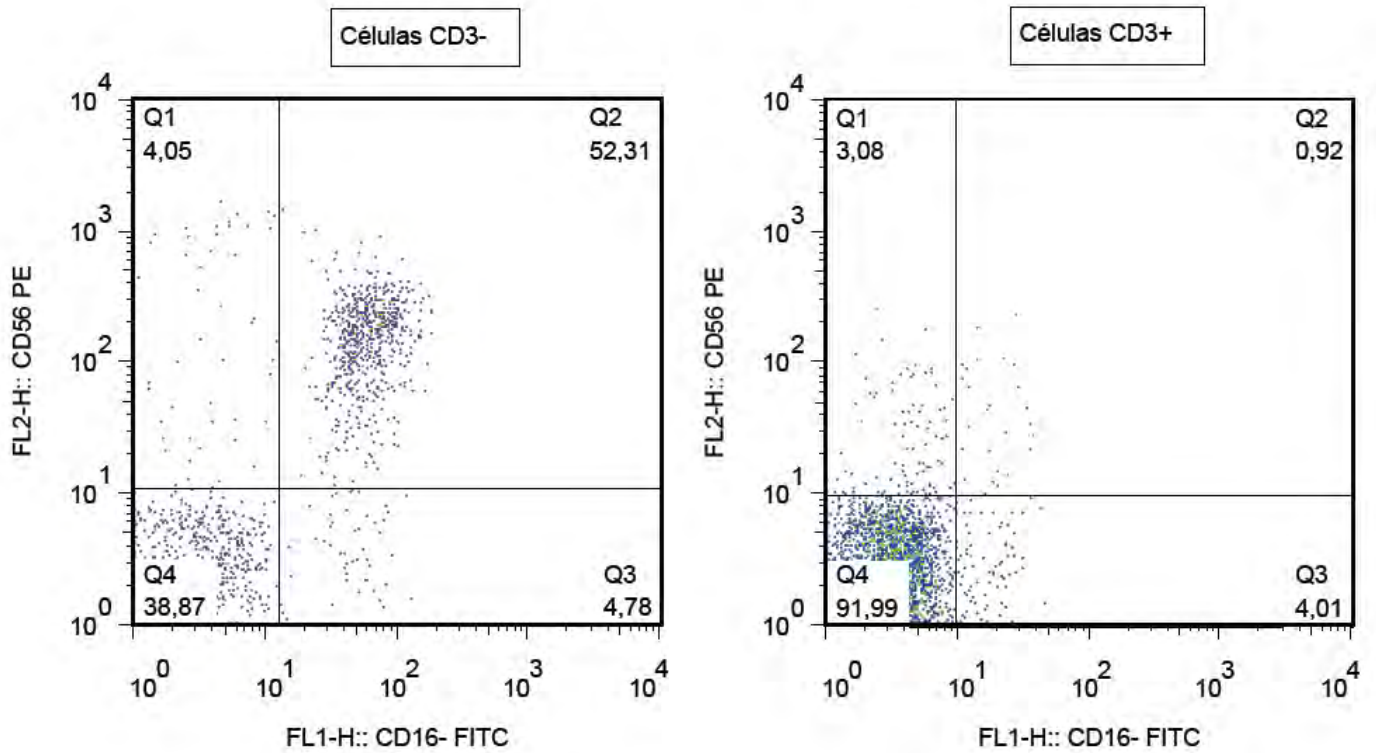


Figura 5. Gráfico do tipo “pseudocolor” mostrando no quadrante superior a esquerda de ambos os gráficos (Q1) a população positiva para CD56 e negativa para CD16, no quadrante superior à direita (Q2) a população duplamente positiva para CD56 e CD16, no quadrante inferior à direita (Q3) a população positiva para CD16 e no quadrante inferior à esquerda (Q4) a população duplamente negativa para CD56 e CD16

### **3.2.2 Aspectos éticos e legais**

O protocolo da presente pesquisa, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apresentados e aprovados pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo I e II). As doadoras foram esclarecidas sobre o protocolo de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.2.3 Análise Estatística**

As informações foram codificadas e digitadas em banco de dados no programa GraphPad Prism para Windows versão 5.00 (GraphPad Software, Inc.), 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 dos marcadores avaliados não segue a normalidade ( $p < 0,001$ ). Portanto, nesta análise foram empregados testes não paramétricos, que são mais robustos a violação deste pressuposto. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney (dois grupos) ou Kruskal-Wallis (três grupos) conforme indicados. As diferenças 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  $51,67 \pm 2,8$  anos, com variação entre 19 e 86 anos. Para a paridade a média foi de  $2,6 \pm 0,6$  partos com variação entre 0 e 11 partos. No grupo de pacientes com câncer de ovário, o estadiamento (FIGO- anexo III) foi IA em 3 dos casos (17,6%), IC em 1 paciente (5,9%), 12 casos com estadiamento IIIc (70,6%) e uma paciente com estadiamento IV (5,9%). A dosagem de CA-125 obtida nos exames pré-operatórios foi maior que 600 UI/mL em 58,9% dos casos de câncer de ovário e menor que 50 UI/mL em 100% dos casos de neoplasia ovariana benigna.

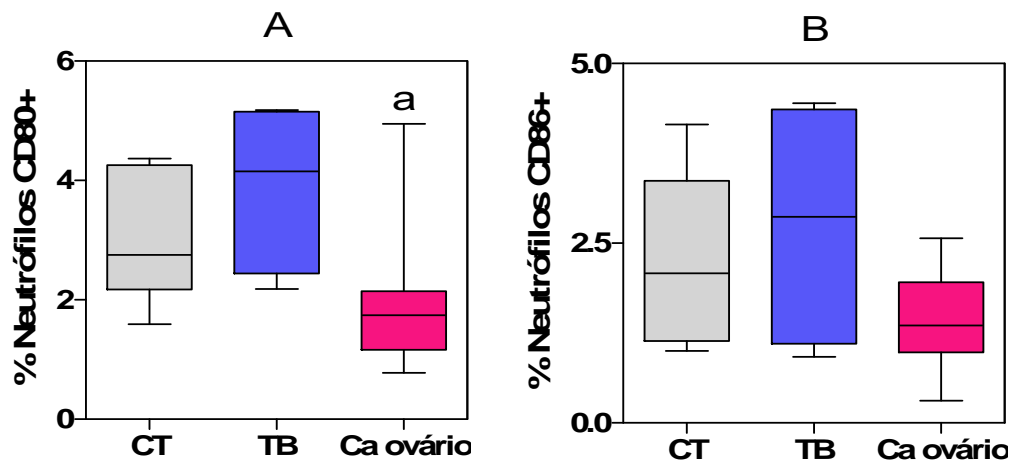
#### **4.2 Análise *ex vivo* da porcentagem de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna**

Foi realizada, nesse estudo, a análise do percentual de neutrófilos no sangue periférico de mulheres sem evidência de neoplasia, e mulheres com neoplasia ovariana benigna e maligna, empregando ensaios de dupla marcação e a estratégia de análise convencional, como descrito na metodologia.

Os resultados da porcentagem de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) na população de neutrófilos totais do sangue periférico estão representados na Figura 6 A e B. A análise dos dados mostrou redução significativa no grupo de pacientes com câncer de ovário em relação ao grupo controle para a expressão da molécula de superfície CD80 ( $p=0,0154$ ), o que não foi observado para a

---

molécula de CD86 ( $p=0,1606$ ).



**Figura 6:** Porcentagem de moléculas co-estimuladoras CD80 (A) e CD86 (B) por neutrófilos do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de neutrófilos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos). A diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CT e Ca Ovário está representada pelas letras a.

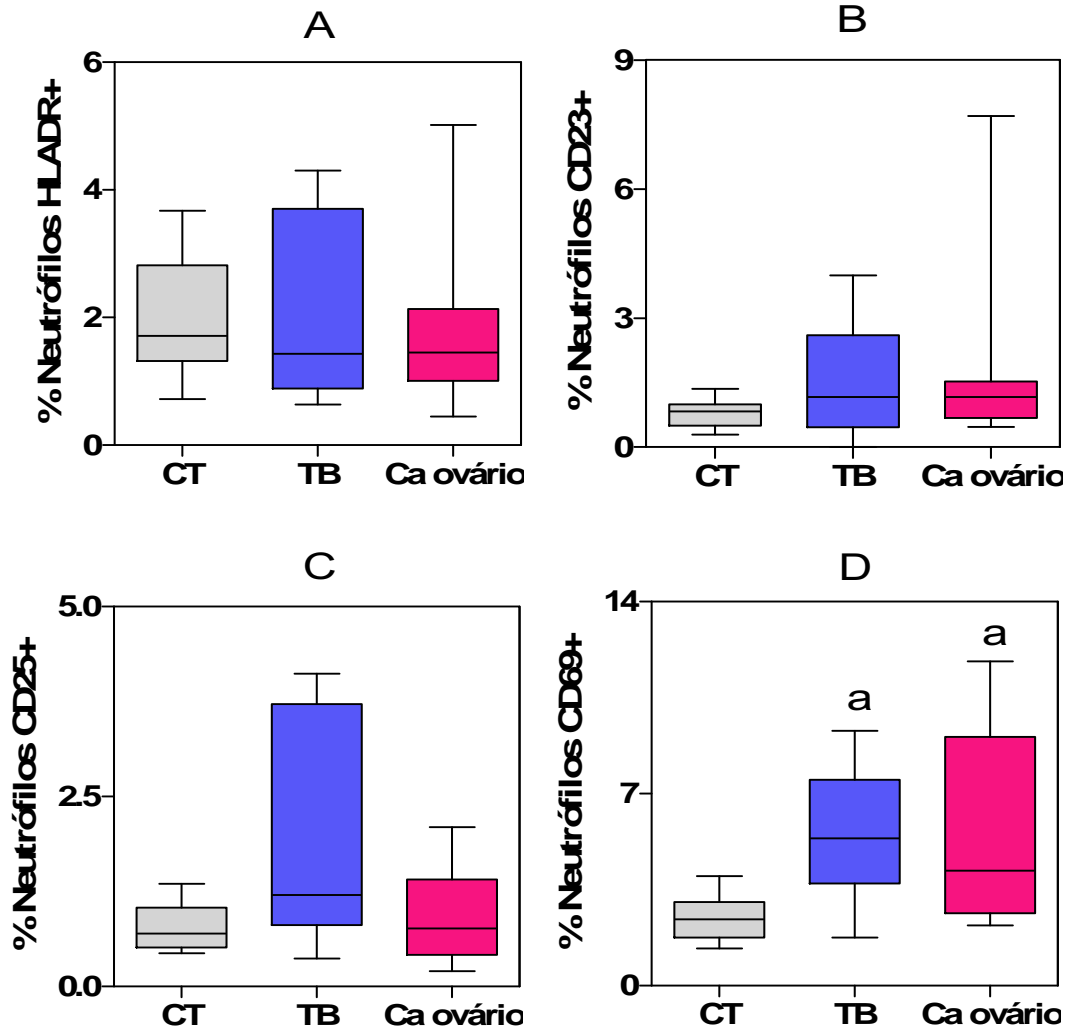
(A,  $p=0,0154$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ;

(B,  $p=0,1606$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

#### 4.3 Análise *ex vivo* da porcentagem de moléculas de ativação por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna

A Figura 7A e 7B mostra os resultados do percentual de moléculas de ativação por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna linfócitos. A análise dos resultados mostrou que o percentual de neutrófilos CD69 apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p=0,0178$ ). Entretanto as populações de neutrófilos CD23, CD25 e

HLA-DR não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos ( $p=0,2474$ ,  $p=0,1428$ ,  $p=0,8069$  respectivamente).



**Figura 7:** Porcentagem de moléculas de ativação HLA-DR (A), CD23 (B), CD25 (C) e CD69 (D) por neutrófilos do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de neutrófilos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos). A diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CT vs Ca Ovário e CT vs Ca Ovário estão representados pelas letras a.

(A,  $p=0,8069$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ;

(B,  $p=0,2474$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

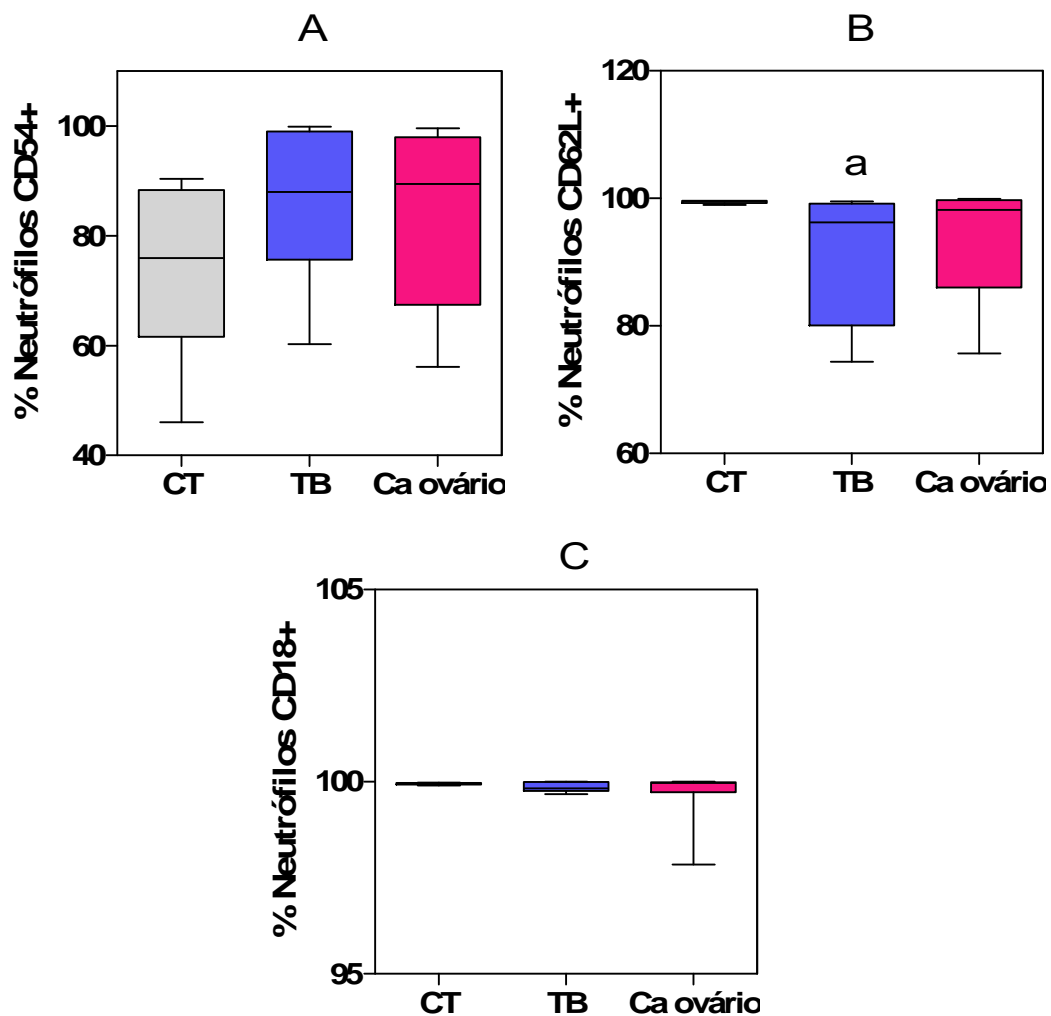
(C,  $p=0,1428$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

(D,  $p=0,0178$ ) - CT vs. TB:  $p < 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .



#### 4.4 Análise *ex vivo* da porcentagem de moléculas de adesão celular por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna

.Em relação à análise das moléculas de adesão celular (CD54, CD62L e CD18), figura 8, não se observou diferença estatística entre os grupos, exceto para a molécula CD62L que reduziu sua expressão entre o grupo de mulheres com neoplasia ovariana benigna quando comparado com o controle ( $p=0,0396$ ).



**Figura 8:** Porcentagem de moléculas de adesão celular CD54 (A), CD62L (B) e CD18 (C) por neutrófilos do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de neutrófilos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos). A diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CT vs TB está representada pela letra a.

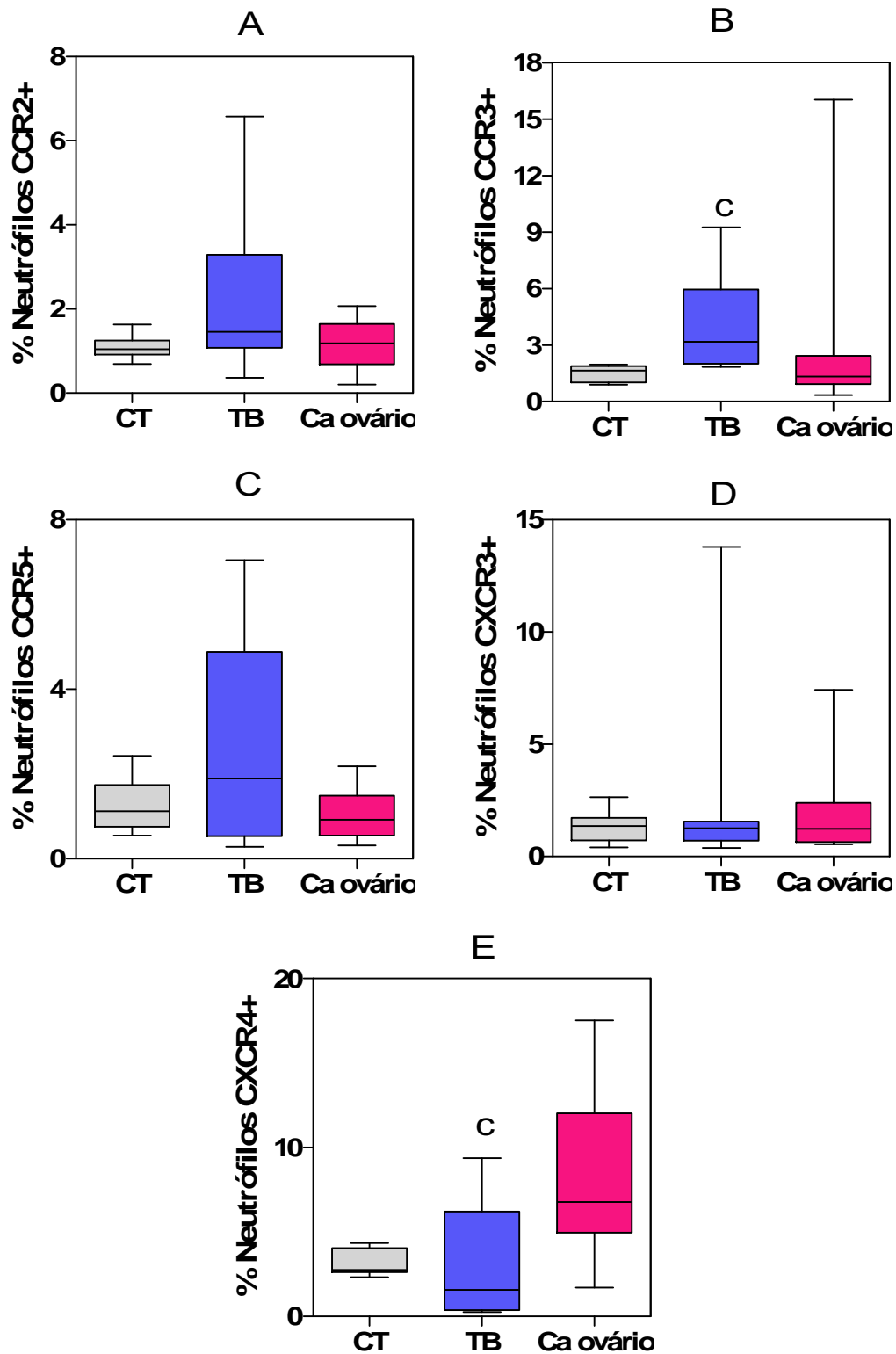
(A,  $p=0,1012$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ;

(B,  $p=0,0396$ ) - CT vs. TB:  $p < 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

(C,  $p=0,9767$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

#### **4.5 Análise ex vivo da porcentagem de receptores de quimiocinas (CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 e CXCR4) por neutrófilos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna**

.A análise da porcentagem de receptores de quimiocinas (CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 e CXCR4) por neutrófilos do sangue periférico entre os grupos não mostrou diferença estatística para as moléculas CCR2, CCR5 e CXCR3 ( $p=0,238$ ,  $p=0,365$ ,  $p=0,893$  respectivamente), figura 9. Entretanto, verificou-se diferença estatística entre os grupos de neoplasia ovariana benigna e maligna para os receptores CCR3 e CXCR4 ( $p=0,0315$ ,  $p=0,0092$  respectivamente).



**Figura 9:** Porcentagem de receptores de quimiocinas CCR2 (A), CCR3 (B), CCR5 (C), CXCR3 (D) e CXCR4 (E) por neutrófilos do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de neutrófilos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos). A diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo TB vs Ca Ovário está representada pela letra c.

(A ,  $p=0,2387$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ;

(B ,  $p=0,0315$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ .

(C ,  $p=0,3652$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

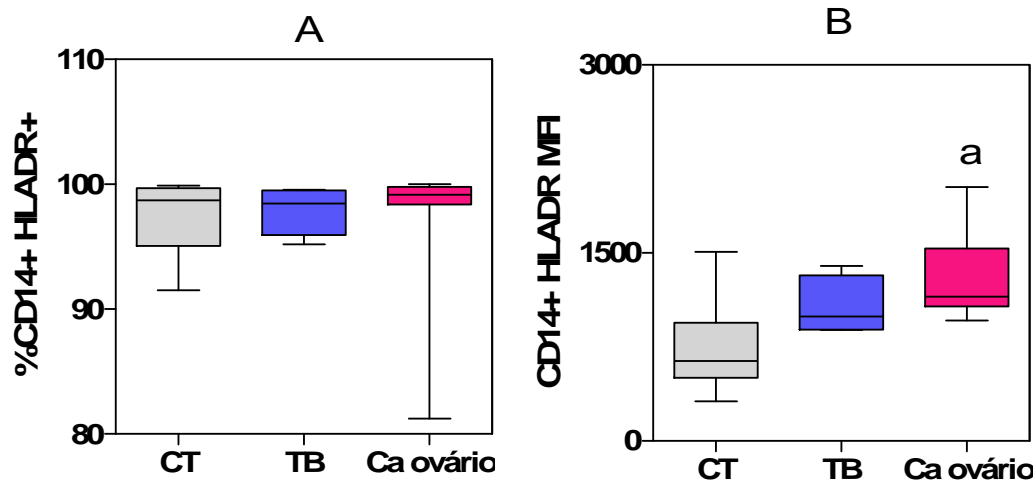
(D ,  $p=0,8930$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

(E ,  $p=0,0092$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ .

#### **4.6 Análise ex vivo da porcentagem da molécula de ativação HLA-DR e intensidade média de fluorescência da molécula de ativação HLA-DR por monócitos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.**

Ao se verificar a porcentagem da molécula de ativação HLA-DR e a intensidade média de fluorescência da molécula de ativação HLA-DR por monócitos, figura, 10, observou-se que houve diferença estatística apenas entre os grupos controle e o de neoplasia ovariana maligna com aumento da intensidade média de fluorescência dessa molécula no grupo de mulheres com neoplasia maligna ( $p=0,0151$ ).

---



**Figura 10:** Porcentagem da molécula de ativação HLA-DR (A) e intensidade média de fluorescência da molécula de ativação HLA-DR (B) por monócitos do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de monócitos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos). A diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CT vs Ca Ovário está representada pela letra a.

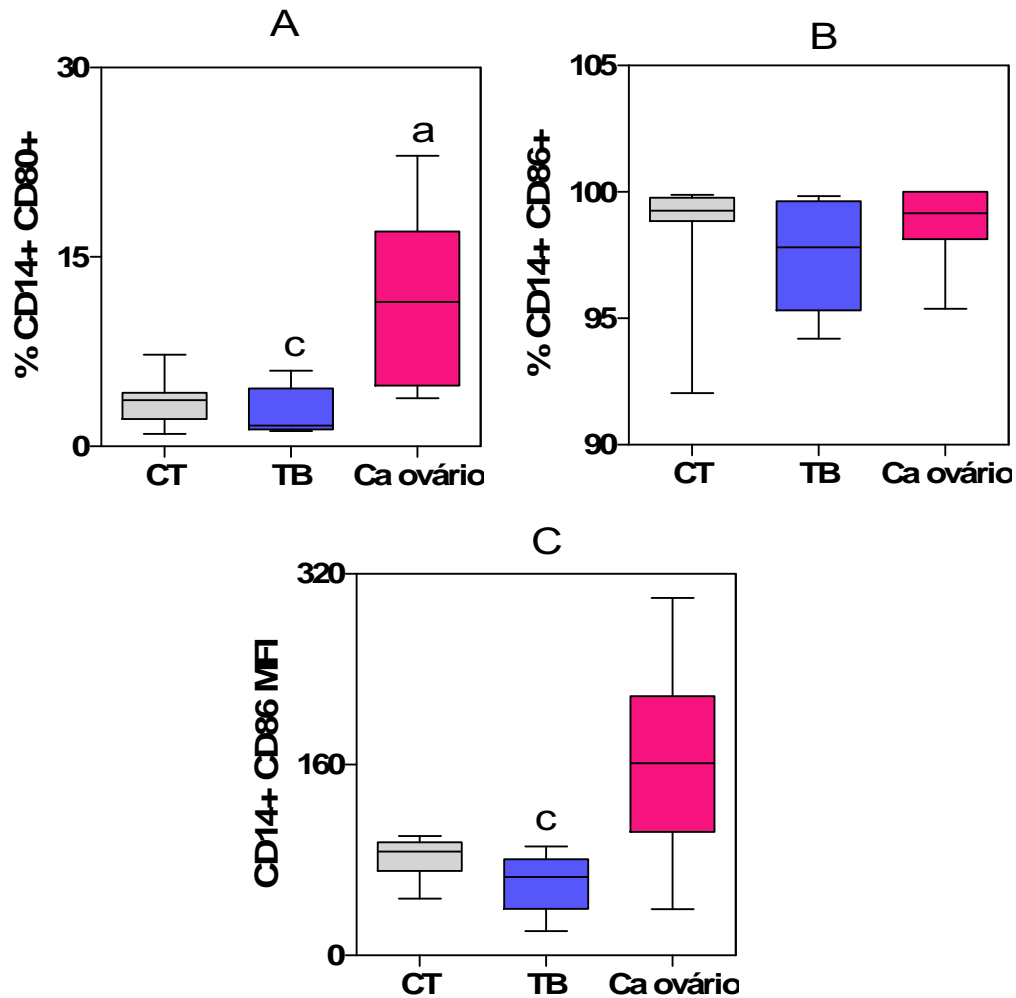
(A,  $p=0,5201$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ;

(B,  $p=0,0151$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

#### 4.7 Análise *ex vivo* da porcentagem das moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) e intensidade média de fluorescência da molécula de co-estimulação (CD86) por monócitos do sangue periférico de mulheres do grupo controle, neoplasia ovariana benigna e maligna.

A análise da porcentagem das moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) por monócitos mostrou aumento significativo para a expressão da molécula CD80 entre os grupos de tumor maligno comparados ao controle ( $p < 0,05$ ) e entre o grupo maligno comparado ao de mulheres com neoplasia benigna ( $p < 0,05$ ). Não foi demonstrado diferença estatística entre os três grupos para a

molécula CD86. Entretanto, observou-se aumento significativo da intensidade de fluorescência para a molécula CD86 do grupo de neoplasia ovariana benigna para o de neoplasia maligna ( $p < 0,05$ ), figura 11.



**Figura 11:** Porcentagem das moléculas de co-estimulação CD80 (A) e CD86 (B) e intensidade média de fluorescência da molécula de co-estimulação CD86 (C) por monócitos do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de monócitos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos). A diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo CT vs Ca Ovário e TB vs Ca Ovário estão representadas pelas letras **a** e **c**, respectivamente.

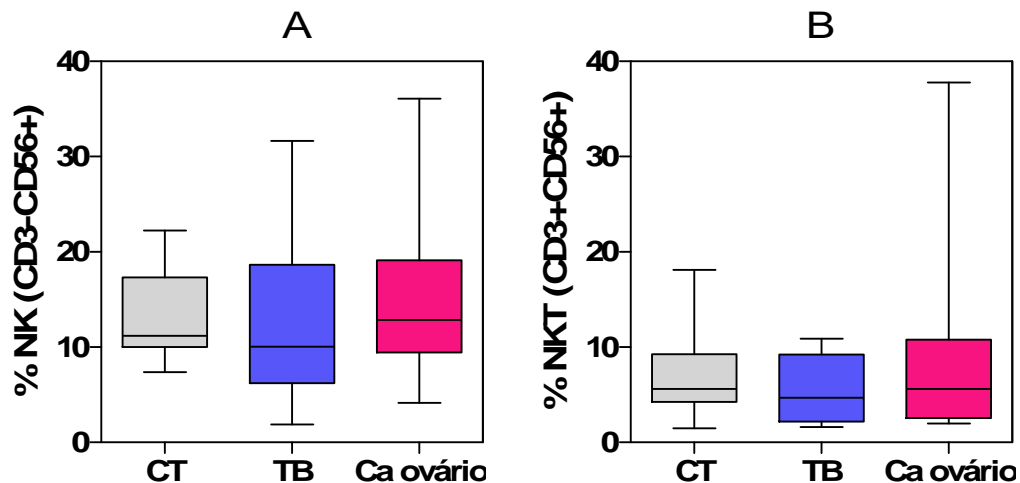
(A,  $p=0,0031$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ ;

(B,  $p=0,5224$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

(C,  $p=0,0073$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p < 0,05$ .

**4.8 Análise ex vivo da porcentagem dos linfócitos NK (CD3-CD56+) e linfócitos NKT (CD3+CD56+) no sangue periférico de pacientes hígdas, pacientes com tumor benigno e pacientes câncer de ovário.**

A análise da porcentagem de linfócitos NK e NKT não demonstrou diferença estatística entre os grupos ( $p=0,653$ ,  $p=0,527$  respectivamente), figura 12.



**Figura 12:** Porcentagem das moléculas CD3-CD56+ (A) e CD3+CD56+ (B) por linfócitos (NK e NKT, respectivamente) do sangue periférico do grupo controle (CT=10), grupo com tumor benigno (TB=09) e grupo com câncer de ovário (CA Ovário=17). Os resultados estão apresentados como porcentagem de linfócitos, expressando os marcadores de superfície avaliados, em formato de gráficos de boxes que destacam os valores: mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo.

As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis (3 grupos) ou Mann-Whitney (2 grupos).

(A,  $p=0,6536$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ;

(B,  $p=0,5278$ ) - CT vs. TB:  $p > 0,05$ ; CT vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ ; TB vs. Ca Ovário:  $p > 0,05$ .

## *5. Discussão*

---



O câncer de ovário apresenta diagnóstico tardio e alta letalidade, o que justifica a busca de marcadores diagnósticos e prognósticos [28]. O estudo da resposta imune representa uma linha de pesquisa com grande potencial em oncologia, devido à sua importância nos processos de carcinogênese [29, 30]

A presença de infiltrado leucocitário no sítio tumoral leva a especulações sobre o quanto essas células contribuem para o controle da progressão tumoral. Apesar das inúmeras tentativas de se correlacionar o grau e o tipo de infiltrado celular com o prognóstico ou sobrevida do paciente com câncer, não há consenso sobre o real significado do infiltrado leucocitário nesses casos [31].

As células imunes têm a capacidade de eliminar as células malignas e regular a progressão tumoral. Contudo, as células imunes do microambiente tumoral são disfuncionais, geralmente falham no controle da expansão tumoral podendo, inclusive, promover o crescimento da neoplasia. Os mecanismos moleculares responsáveis pela indução tumoral e pela supressão do sistema imune têm sido cada vez mais estudados. Admiti-se a hipótese de que o tumor altera o recrutamento, a função e a sobrevida das células imunes, interferindo em todas as etapas da resposta imune antitumoral [18, 19].

Diversos mecanismos têm sido relatados como responsáveis pela disfunção do sistema imune nos pacientes com câncer. Alguns desses mecanismos são mediados por fatores produzidos pelos tumores, enquanto outros resultam das alterações da homeostasia que ocorrem devido ao câncer [31-33].

---

Alguns estudos mostram alterações observadas no infiltrado de células imunes presentes no microambiente tumoral como: defeitos de sinalização [34], ativação de enzimas proteolíticas no infiltrado leucocitário com degradação de proteínas celulares, alteração na expressão de citocinas, inibição da migração leucocitária, indução da apoptose nas células T, expansão de macrófagos imunossupressores com alteração de função, acúmulo de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, inibição da proliferação de linfócitos e de sua atividade citotóxica [5, 6, 31].

As células tumorais também são capazes de desenvolver resistência aos mecanismos imunológicos que poderiam levar à sua destruição. Experimentos mostram a ocorrência de imunoseleção de células tumorais resistentes, além da produção de fatores supressores derivados da neoplasia [3, 35].

Neste estudo avaliou-se as moléculas de expressão da superfície celular dos neutrófilos (CD16, CD18, CD19, CD23, CD25, CD54, CD56, CD62, CD69, CD80, CD86, HLA-DR, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3, CXCR4), monócitos (células CD14 que expressam: CD80, CD86 e HLA-DR) e células NK (CD3<sup>-</sup> e <sup>+</sup> que expressam CD56) em pacientes com câncer de ovário, visando caracterizar possíveis associações que permitissem a utilização destes como marcadores no câncer de ovário. A escolha dessas moléculas foi justificada pela possibilidade de avaliação da resposta imune inata através de suas análises [36-40].

A citometria de fluxo foi o método de escolha para a dosagem das moléculas de superfície celular expressas pelas células imunes. A maioria das técnicas

---

para medidas de amostras solúveis utiliza tecnologia baseada no ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) [41].

A metodologia empregada neste estudo utiliza como princípio uma mescla da tecnologia baseada no ELISA que é a citometria de fluxo, o que aumenta a sensibilidade de detecção dos analitos avaliados e agrega vantagens à sua utilização.

O uso desta técnica permite a análise quantitativa de múltiplos parâmetros em uma única amostra além da utilização de mínimos volumes de amostra para obter seus resultados. Os resultados obtidos apresentam reprodutibilidade comparáveis com outras técnicas, como as baseadas na tecnologia ELISA.

A citometria permite comparação direta com os ensaios já existentes, além da avaliação mais rápida de múltiplas amostras em uma mesma plataforma [41-43]

Devido às suas características, a citometria de fluxo amplia sua possibilidade de inserção na abordagem clínica diária. Painéis de marcadores bioquímicos podem ser avaliados conjuntamente e seus achados utilizados como biomarcadores complexos para detecção de tumores iniciais ou melhor avaliação prognostica de cada caso

Neste estudo tivemos uma amostra de 10 mulheres no grupo controle, 9 com neoplasia benigna e 17 com neoplasia maligna, totalizando 36 mulheres. 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 estadios da neoplasia. O câncer de ovário apresenta baixa prevalência, assim, amostras maiores, em estudos multicêntricos podem representar a melhor abordagem.

Ao analisarmos as moléculas co-estimuladoras CD80 nos neutrófilos de sangue periférico, podemos observar uma redução significativa da expressão dessas moléculas nas mulheres com câncer em relação ao grupo controle. Zou et al apresentou resultados semelhantes aos nossos, com redução da expressão de CD80 e CD86 em neutrófilos de pacientes com câncer [44]. Isso poderia justificar a alteração de função dessas células relacionadas à fagocitose e produção de citocinas, já que essas moléculas são co-estimuladoras para a ativação de linfócitos T.

Em relação às moléculas de ativação em neutrófilos CD23, CD25, CD69 e HLA-DR, verificou-se aumento significativo da expressão de CD69 no grupo de mulheres com neoplasia benigna e maligna de ovário em relação ao grupo controle. Vários estudos demonstram disfunção na sinalização molecular no microambiente tumoral devido à alteração da expressão de moléculas de ativação. Sinais de ativação e coestimulação iniciam e orientam a resposta imune, porém a transmissão normal desse sinal é falha na presença do tumor [31-33, 45-47]. Há evidências de que o aumento da expressão de CD69 está associado com a redução de células dendríticas no hospedeiro, aumento da massa tumoral e piora da ascite nas pacientes com câncer de ovário [31, 48].

---

Diversos trabalhos mostram que a redução da expressão de algumas moléculas de adesão em pacientes com câncer, auxilia no crescimento e desenvolvimento tumoral [31, 44]. Por outro lado, um estudo demonstrou que o aumento da expressão de CD18 em neutrófilos de mulheres com câncer de ovário estadios III e IV estava associado com o aumento do potencial metastático tumoral [49]. Não verificamos diferença estatística entre os grupos em relação à análise das moléculas de adesão celular (CD54, CD62L e CD18), exceto para a molécula CD62L que reduziu sua expressão entre o grupo de mulheres com neoplasia ovariana benigna quando comparado com o controle ( $P < 0,039$ ).

A associação e interação da resposta imune tumoral, em especial a inflamação crônica, com a subsequente ativação de citocinas, fatores de crescimento, e quimiocinas tem sido amplamente explorada [29]. Existem vários trabalhos [3, 53, 56] mostrando as implicações das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como importantes potencializadores da carcinogênese. Em nossas análises, a porcentagem de receptores de quimiocinas (CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 e CXCR4) por neutrófilos, mostrou diferença significativa apenas entre os grupos de neoplasia ovariana benigna e maligna para os receptores CCR3 e CXCR4. Esses achados podem ser consequência do número de pacientes em cada grupo. O aumento de nossa amostra poderia permitir uma análise comparativa mais fidedigna entre os grupos.

Ao se verificar a porcentagem da molécula de ativação HLA-DR e a intensidade média de fluorescência da molécula de ativação HLA-DR por monócitos

---

observou-se que houve diferença estatística entre os grupos controle e o de neoplasia ovariana maligna com aumento da intensidade média de fluorescência dessa molécula nas mulheres com câncer de ovário. A alteração da expressão das moléculas de HLA-DR tem sido descrita em vários trabalhos [19, 44, 57, 58]. Essa alteração mostra que existe ativação dos monócitos, mas que estes se apresentam disfuncionais. Isso propicia o escape tumoral ao reconhecimento das células imunes do hospedeiro, além de alterar a sinalização para recrutamento e ativação de outros componentes envolvidos na imunidade antitumoral [57].

A análise da porcentagem das moléculas de co-estimulação (CD80 e CD86) por monócitos mostrou aumento significativo para a expressão da molécula CD80 entre os grupos de tumor maligno comparados ao controle e ao de mulheres com neoplasia benigna. Observou-se também aumento significativo da intensidade de fluorescência para a molécula CD86 do grupo de neoplasia ovariana benigna para o de neoplasia maligna. Esses achados já foram demonstrados na literatura. Alguns trabalhos verificaram o aumento da expressão dessas moléculas em monócitos, com a justificativa de que esse aumento propiciaria o maior reconhecimento dessas células pelos linfócitos T regulatórios tumorais, o que aumentaria as taxas de apoptose desses monócitos [44, 57, 58].

A alteração de recrutamento, ativação, citotoxicidade e produção de citocinas pelas células *Natural Killers* já foi relatada em diversos estudos [59, 60].

---

Entretanto, em nossas análises não se observou diferenças significativas na expressão das moléculas de superfície dessas células.

Um número maior de pacientes, neste estudo, poderia permitir uma maior estratificação dos casos e facilitaria uma melhor análise da interação destes agentes do sistema imune com os diversos estadios do câncer de ovário. Do mesmo modo, a correlação com os valores de CA125 seria de grande importância no seguimento da doença. No entanto, o câncer de ovário apresenta baixa prevalência, assim, amostras maiores, em estudos multicêntricos podem representar a melhor abordagem.

---

## *6. Conclusão*

---



---

A caracterização dos aspectos fenotípicos celulares da imunidade inata sérica em mulheres com câncer de ovário no presente estudo permite concluir que:

- ▶ A expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 em neutrófilos está reduzida nas mulheres com câncer de ovário o que leva à alteração de fagocitose. Além disso, o aumento da expressão da molécula CD69 em neutrófilos nas mulheres com câncer de ovário associa-se à alteração de sinalização molecular da resposta imune no microambiente tumoral.
- ▶ Os monócitos de pacientes com câncer de ovário, apesar de se mostrarem ativos com a expressão de HLA-DR, são disfuncionais, o que propicia o escape tumoral à imunovigilância. Do mesmo modo, o aumento da expressão das moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 nos monócitos de pacientes com câncer é responsável pelo maior reconhecimento dessas células pelos linfócitos T regulatórios tumorais, o que aumenta as taxas de apoptose desses monócitos, propiciando o crescimento e desenvolvimento tumoral.
- ▶ Não houve alteração fenotípica nas células NK entre as mulheres avaliadas.

Os resultados desse estudo revelam a importância do aprimoramento dos conhecimentos da biologia molecular, fisiopatologia e imunologia relacionados ao câncer de ovário, para a criação de possíveis estratégias terapêuticas baseadas na imunoterapia para a neoplasia ovariana. Contudo, são necessários estudos complementares para um melhor entendimento do

---

papel dessas alterações fenotípicas nas células da resposta imune inata nesta complexa interação tumor hospedeiro.

---

## *7. Referências Bibliográficas*

---

1. SOCIETY, A.C., *Cancer Facts & Figures 2009*. American Cancer Society, 2009: p. 1-70.
  2. BRASIL, *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*, M.d. Saúde, Editor. 2009, INCA: Rio de Janeiro. p. 1-98.
  3. Landen, C.N., Jr., M.J. Birrer, and A.K. Sood, *Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(6): p. 995-1005.
  4. Roett, M.A. and P. Evans, *Ovarian cancer: an overview*. Am Fam Physician, 2009. **80**(6): p. 609-16.
  5. Tomsova, M., et al., *Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(2): p. 415-20.
  6. Nelson, B.H., *The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 101-16.
  7. Freedman, R.S., et al., *Migration deficit in monocyte-macrophages in human ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(5): p. 635-45.
  8. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 203-13.
  9. 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.
  10. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 24-37.
  11. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 199-205.
  12. 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.
  13. 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.
-

14. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 540-50.
  15. 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.
  16. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 71-8.
  17. 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.
  18. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
  19. Bellati, F., et al., *Immunology of gynecologic neoplasms: analysis of the prognostic significance of the immune status*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(4): p. 541-65.
  20. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 909-15.
  21. Shah, C.A., et al., *Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(2): p. 215-9.
  22. Leffers, N., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(3): p. 449-59.
  23. 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.
  24. Ness, R.B. and C. Cottréau, *Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(17): p. 1459-67.
  25. Dietl, J., J.B. Engel, and J. Wischhusen, *The role of regulatory T cells in ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(4): p. 764-70.
  26. Hung, C.F., et al., *Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 43-69.
-

- 
27. Andrade, S.P., et al., *Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method*. *Microvasc Res*, 1997. **54**(3): p. 253-61.
  28. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(1): p. 10-30.
  29. 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.
  30. 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.
  31. Whiteside, T.L., *Immune responses to malignancies*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(2 Suppl): p. S677-86.
  32. Reichert, T.E., et al., *Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(10): p. 3137-45.
  33. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
  34. Bukowski, R.M., et al., *Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(10): p. 2337-47.
  35. Vujanovic, N.L., *Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells*. *Int Rev Immunol*, 2001. **20**(3-4): p. 415-37.
  36. Sayed, D.M., M.M. el-Attar, and A.A. Hussein, *Evaluation of flow cytometric immunophenotyping and DNA analysis for detection of malignant cells in serosal cavity fluids*. *Diagn Cytopathol*, 2009. **37**(7): p. 498-504.
  37. Finn, W.G., et al., *Analysis of clinical flow cytometric immunophenotyping data by clustering on statistical manifolds: Treating flow cytometry data as high-dimensional objects*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008. **76B**(1): p. 1-7.
  38. Gelderman, M.P. and J. Simak, *Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles*. *Methods Mol Biol*, 2008. **484**: p. 79-93.
-

- 
39. Xu, Y., et al., *Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis*. Am J Clin Pathol, 2005. **124**(5): p. 799-806.
  40. Wang, S., et al., *Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with sezary syndrome: detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue*. Am J Clin Pathol, 2004. **122**(5): p. 774-82.
  41. 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.
  42. 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.
  43. 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.
  44. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
  45. van der Merwe, P.A. and S.J. Davis, *Molecular interactions mediating T cell antigen recognition*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 659-84.
  46. Baniyash, M., *Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 80-8.
  47. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 467-77.
  48. Huarte, E., et al., *Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity*. Cancer Res, 2008. **68**(18): p. 7684-91.
  49. Klink, M., et al., *Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro*. Scand J Immunol, 2008. **68**(3): p. 328-36.
  50. De Marzo, A.M., et al., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 256-69.
  51. 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.
-

- 
52. 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.
  53. Dinarello, C.A., *The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 307-13.
  54. Zaenker, K.S., *Infection, inflammation and neoplasia: an interdisciplinary challenge*. Contrib Microbiol, 2006. **13**: p. 232-9.
  55. Smyth, M.J., et al., *Cytokines in cancer immunity and immunotherapy*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 275-93.
  56. Ben-Baruch, A., *The multifaceted roles of chemokines in malignancy*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 357-71.
  57. Mantovani, A., et al., *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 315-22.
  58. Melichar, B., et al., *Phenotype and antitumor activity of ascitic fluid monocytes in patients with ovarian carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2003. **13**(4): p. 435-43.
  59. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
  60. Belisle, J.A., et al., *Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125)*. Immunology, 2007. **122**(3): p. 418-29.
-



## 8. *Anexas*

---

## I. 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 Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## II. Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM CÂNCER GINECOLÓGICO

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

A participação no estudo consiste em doar uma amostra de sangue, ascite e um fragmento da peça cirúrgica (útero ou ovário) para serem analisados. Essa participação não modifica o tratamento proposto para a sua doença.

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 de uma biópsia do útero ou ovário. A coleta de sangue será realizada no momento da punção para administração do soro. As complicações serão as mesmas relacionadas ao procedimento cirúrgico (retirada do útero e/ou ovário).

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: a peça cirúrgica será encaminhada à Anatomia Patológica para ser examinada.

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: Prof. Agnaldo L. Silva Filho

Endereço: Avenida Professor Alfredo Balena 110/4<sup>o</sup> andar. Santa Efigênia. Belo Horizonte. Minas Gerais. CEP: 30 130 100. Tel: (31) 32489764 / 92250909

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho: Tel (31) 33497764

COEP/UFMG:

Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Unid. Adm. II - 2<sup>o</sup> andar - SI 2005 - Pampulha - Belo Horizonte/MG - 31.270-090 Tel: (31) 34094592

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

De pleno acordo

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 2009)

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

IIa Tumor acomete trompas e/ou útero

IIb Extensão a outros órgãos pélvicos

IIc 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*

---

**Abstract**

**Introduction:** Ovarian cancer presents late diagnosis and high mortality due to lack of sensitive and specific biomarkers and the rapid progression of this cancer, asymptomatic in early stages. Immune cells have the ability to eliminate malignant cells and regulate tumor progression. However, the immune cells of the tumor microenvironment are dysfunctional and fail to control the tumor growth and may even promote the growth of cancer. Despite numerous attempts to correlate the degree and type of cellular infiltrate and the prognosis or survival of patients with ovarian cancer, there is no consensus about the real meaning of the leukocyte infiltrate in these cases. Thus, this study aims to increase knowledge about the innate immunity in women with ovarian cancer through characterization of phenotypic cellular aspects of innate immunity levels.

**Methods:** This is a Cross-sectional study evaluated 36 women who underwent clinical examination, gynecological examination, transvaginal ultrasound and treatment with laparotomy as indicated pelvic mass. According to the results of these tests, the women selected were grouped into two groups: control, absence of malignancy, with benign ovarian neoplasm and malignant ovarian neoplasm. The serum levels of serum molecules surface expression of cells of the innate immune response with analysis by flow cytometry. Differences between groups were evaluated

---

by the Mann-Whitney (two groups) or Kruskal-Wallis (three groups) as indicated. Differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

**Results:** We selected 36 patients: 10 women in the control group, 9 in the group of benign ovarian neoplasm and 17 in the group of malignancy. More than 70% of patients with ovarian cancer presented with advanced disease and values of CA125 much changed. For the analysis found, there was a change between the groups for molecules expression in neutrophils CD80, CD69, CD62L, CCR3 and CXCR4. The molecules expressed by monocytes differences were found in the fluorescence intensity of HLA-DR and CD86 and CD80 expression. There was no statistical difference in the analysis of surface molecules of NK cells between the groups.

**Conclusion:** The results of these experiments showed alterations in the expression of some surface molecules of cells of the innate immune response between the groups, which helps in the progression of carcinogenesis.

**Keywords:** ovarian cancer, benign ovarian tumor, immune response, monocytes, neutrophils, NK cells.

---

1. SOCIETY, A.C., *Cancer Facts & Figures 2009*. American Cancer Society, 2009: p. 1-70.
2. BRASIL, *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*, M.d. Saúde, Editor. 2009, INCA: Rio de Janeiro. p. 1-98.
3. Landen, C.N., Jr., M.J. Birrer, and A.K. Sood, *Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(6): p. 995-1005.
4. Roett, M.A. and P. Evans, *Ovarian cancer: an overview*. *Am Fam Physician*, 2009. **80**(6): p. 609-16.
5. Tomsova, M., et al., *Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2008. **108**(2): p. 415-20.
6. Nelson, B.H., *The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes*. *Immunol Rev*, 2008. **222**: p. 101-16.
7. Freedman, R.S., et al., *Migration deficit in monocyte-macrophages in human ovarian cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(5): p. 635-45.
8. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(3): p. 203-13.
9. 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.
10. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(1): p. 24-37.
11. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(3): p. 199-205.
12. 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.
13. 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.
14. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 540-50.
15. 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.
16. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 71-8.
17. 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.
18. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 137-48.
19. Bellati, F., et al., *Immunology of gynecologic neoplasms: analysis of the prognostic significance of the immune status*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(4): p. 541-65.



- 
20. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 909-15.
  21. Shah, C.A., et al., *Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(2): p. 215-9.
  22. Leffers, N., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(3): p. 449-59.
  23. 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.
  24. Ness, R.B. and C. Cottreau, *Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(17): p. 1459-67.
  25. Dietl, J., J.B. Engel, and J. Wischhusen, *The role of regulatory T cells in ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(4): p. 764-70.
  26. Hung, C.F., et al., *Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 43-69.
  27. Andrade, S.P., et al., *Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method*. Microvasc Res, 1997. **54**(3): p. 253-61.
  28. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
  29. 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.
  30. 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.
  31. Whiteside, T.L., *Immune responses to malignancies*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S677-86.
  32. Reichert, T.E., et al., *Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(10): p. 3137-45.
  33. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
  34. Bukowski, R.M., et al., *Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(10): p. 2337-47.
  35. Vujanovic, N.L., *Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(3-4): p. 415-37.
  36. Sayed, D.M., M.M. el-Attar, and A.A. Hussein, *Evaluation of flow cytometric immunophenotyping and DNA analysis for detection of malignant cells in serosal cavity fluids*. Diagn Cytopathol, 2009. **37**(7): p. 498-504.
  37. Finn, W.G., et al., *Analysis of clinical flow cytometric immunophenotyping data by clustering on statistical manifolds: Treating flow cytometry data as high-dimensional objects*. Cytometry B Clin Cytom, 2008. **76B**(1): p. 1-7.
  38. Gelderman, M.P. and J. Simak, *Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles*. Methods Mol Biol, 2008. **484**: p. 79-93.
-

39. Xu, Y., et al., *Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis*. Am J Clin Pathol, 2005. **124**(5): p. 799-806.
40. Wang, S., et al., *Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with sezary syndrome: detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue*. Am J Clin Pathol, 2004. **122**(5): p. 774-82.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
45. van der Merwe, P.A. and S.J. Davis, *Molecular interactions mediating T cell antigen recognition*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 659-84.
46. Baniyash, M., *Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 80-8.
47. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 467-77.
48. Huarte, E., et al., *Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity*. Cancer Res, 2008. **68**(18): p. 7684-91.
49. Klink, M., et al., *Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro*. Scand J Immunol, 2008. **68**(3): p. 328-36.
50. De Marzo, A.M., et al., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 256-69.
51. 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.
52. 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.
53. Dinarello, C.A., *The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 307-13.
54. Zaenker, K.S., *Infection, inflammation and neoplasia: an interdisciplinary challenge*. Contrib Microbiol, 2006. **13**: p. 232-9.
55. Smyth, M.J., et al., *Cytokines in cancer immunity and immunotherapy*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 275-93.
56. Ben-Baruch, A., *The multifaceted roles of chemokines in malignancy*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 357-71.
57. Mantovani, A., et al., *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 315-22.
58. Melichar, B., et al., *Phenotype and antitumor activity of ascitic fluid monocytes in patients with ovarian carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2003. **13**(4): p. 435-43.
59. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.

60. Belisle, J.A., et al., *Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125)*. Immunology, 2007. **122**(3): p. 418-29.