



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Aline Evangelista Santiago

**COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE
CITOCINAS, QUIMIOKINAS E MICROPARTÍCULAS
EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA E DE
OVÁRIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

**Botucatu - SP
2017**

Aline Evangelista Santiago

COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE
CITOCINAS, QUIMIOCINAS E MICROPARTÍCULAS
EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA E DE
OVÁRIO

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre(a) em Ginecologia,
Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Botucatu - SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santiago, Aline Evangelista.

Comparação dos níveis séricos de citocinas, quimiocinas e micropartículas em mulheres com câncer de mama e de ovário / Aline Evangelista Santiago. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho
Capes: 40101150

1. Mamas - Câncer. 2. Ovários - Câncer. 3. Citocinas. 4. Quimiocinas. 5. Carcinogênese. 6. Micropartículas derivadas de células.

Palavras-chave: Câncer de mama; Câncer de ovário; Citocinas; Micropartículas; Quimiocinas.



Dedicatória

À minha família pela compreensão das horas em que me fiz ausente e pelas palavras que me deram ânimo e perseverança para a conclusão dessa trajetória.



Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Prof. **Agnaldo Lopes**, pelo apoio e incentivo durante toda a realização do trabalho.

Você é o grande responsável por essa conquista!

Serei sempre grata a você!



Agradecimientos

Agradeço à professora **Andrea Teixeira de Carvalho** e à equipe do Instituto René Rachou (Fiocruz), pelo apoio logístico no processamento do material coletado durante as fases do estudo, pela cortesia e disponibilidade.

Meus agradecimentos aos professores **Eduardo Batista Cândido, Angélica Nogueira e Débora Damasceno** que me auxiliaram na conclusão do trabalho.

Aos professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UNESP.

Aos colegas de curso, pela companhia e amizade.

Às Dra **Sálua Oliveira Calil de Paula** e Dra **Elisa Lopes e Lages**, pela ajuda com a coleta de dados.

Aos funcionários do departamento de Pós-Graduação da UNESP, em especial à **Solange Sako Cagliari**.

À equipe do Hospital Vera Cruz pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa.

Aos **professores e colaboradores** do setor de Pós-Graduação da UFMG.

Às **pacientes**, a quem devo a possibilidade desse estudo.



Epígrafe

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão
resultados”.

Mahatma Gandhi



Resumo

Introdução: A concentração plasmática de citocinas, quimiocinas e micropartículas (MPs) em mulheres com câncer de mama e de ovário é uma forma não invasiva de avaliar a resposta inflamatória/regulatória sistêmica associada a esses tumores e o papel do microambiente formado na resposta pró e antitumoral na paciente. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar o perfil da resposta inflamatória sistêmica do câncer epitelial de ovário (CEO) e do câncer de mama através da medição de citocinas, quimiocinas e MPs, para assim avaliar se existe ou não diferença nesse padrão de resposta inflamatória sistêmica. **Métodos:** Noventa e quatro mulheres sem evidência de malignidade ($n = 30$), com câncer de mama ($n = 38$) ou câncer de ovário epitelial ($n = 26$) foram avaliadas. Foram coletadas amostras plasmáticas e de tecido tumoral. A avaliação dos marcadores inflamatórios foi realizada pela dosagem de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, TNF- α e IFN- γ), quimiocinas (CXCL8, CXCL-9, CXCL 10, CCL 2, CCL5) e MPs (neutrófilos, leucócitos, monócitos, eritrócitos, células endoteliais, plaquetas e linfócitos) por citometria de fluxo / Cytometric Bead Array. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por Kruskal-Wallis. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significantes. **Resultados:** Os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 ($p < 0,001$), TNF- α ($p = 0,004$) e IL-12 ($p = 0,0019$) foram significativamente maiores em pacientes com câncer de ovário em comparação com as mulheres com câncer de mama e com o grupo controle. Pacientes com câncer de ovário foram também associadas a maiores níveis de IL-10 ($p < 0,001$) e das quimiocinas CXCL-9 ($p < 0,001$) e CXCL-10 ($p < 0,001$) em comparação aos outros grupos. Os níveis de MPs derivados de neutrófilos aumentaram significativamente em amostras plasmáticas de pacientes com CEO em comparação com mulheres com câncer de mama e do grupo controle ($p < 0,001$). Em contraste, as MPs derivadas de células endoteliais foram menores nas pacientes com CEO em comparação com os demais grupos ($p = 0,0491$). Houve um equilíbrio entre citocinas, quimiocinas e MPs nos grupos de câncer de mama e controle. A rede de citocinas e quimiocinas inflamatórias/regulatórias em pacientes com CEO apresentou maior complexidade em relação aos demais grupos e com fortes interações nas redes entre fatores inflamatórios e imunológicos plasmáticos. Esta rede incluiu mais biomarcadores associados com correlações negativas e positivas entre eles. **Conclusão:** Este estudo é uma pesquisa promissora e original. Os resultados podem refletir as discrepâncias entre a carcinogênese no câncer de ovário e de mama, sugerindo um padrão inflamatório sistêmico maior no CEO. MPs podem servir como uma nova fonte de informação relacionada à doença.

Palavras-chave: câncer de mama, câncer de ovário, citocinas, micropartículas, quimiocinas



Summary

Introduction: The plasma concentration of cytokines, chemokines and microparticles (MPs) in women with breast and ovarian cancer is a noninvasive way of assessing the systemic inflammatory / regulatory response associated with these tumors and the role of the microenvironment formed in the pro and antitumor response in the patient. Therefore, the objective of this study was to compare the profile of the systemic inflammatory response of epithelial ovarian cancer (EOC) and breast cancer by measuring cytokines, chemokines and MPs, in order to evaluate whether or not there is a difference in this pattern of inflammatory response systemic. **Methods:** Ninety-four women with no evidence of malignancy (n = 30), breast cancer (n = 38) or epithelial ovarian cancer (n = 26) were evaluated. Plasma samples and tumor tissue were collected. The evaluation of inflammatory markers was performed by the measurement of cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, TNF- α and IFN- γ), chemokines (CXCL8, CXCL-9, CXCL-10, CCL-2, CCL-5) and MPs (neutrophils, leukocytes, monocytes, erythrocytes, endothelial cells, platelets and lymphocytes) by flow cytometry / Cytometric Bead Array. The differences between the groups were assessed by Kruskal-Wallis. Differences with $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** Plasma levels of the proinflammatory cytokines IL-6 ($p = 0.001$), TNF- α ($p = 0.004$) and IL-12 ($p = 0.0019$) were significantly higher in ovarian cancer patients compared to women with breast cancer and the control group. Patients with ovarian cancer were also associated with higher levels of IL-10 ($p < 0.001$) and CXCL-9 ($p < 0.001$) and CXCL-10 ($p < 0.001$) chemokines compared to the other groups. Levels of MPs derived from neutrophils increased significantly in plasma samples of EOC patients compared to women with breast cancer and the control group ($p < 0.001$). In contrast, MPs derived from endothelial cells were lower in patients with EOC compared to the other groups ($p = 0.0491$). There was a balance between cytokines, chemokines and MPs in the breast cancer and control groups. The network of inflammatory / regulatory cytokines and chemokines in patients with EOC presented greater complexity in relation to the other groups and with strong interactions in the networks between inflammatory and immunological plasmatic factors. This network included more biomarkers associated with negative and positive correlations between them. **Conclusion:** This study is a promising and original research. The results may reflect the discrepancies between carcinogenesis in ovarian and breast cancer, suggesting a higher systemic inflammatory pattern in the EOC. MPs can serve as a new source of disease-related information.

Keywords: breast cancer, chemokines, cytokines, microparticles, ovarian cancer



Lista de Siglas e Abreviaturas

CEO	– câncer epitelial de ovário
TNF	– fator de necrose tumoral
IL	– interleucina
MPs	– micropartículas
MVs	– microvesículas
miRNA	– micro RNA
VEGF	– fator de crescimento vascular endotelial
PML	– proteína de membrana latente
NF- κ B	– fator de transcrição nuclear kappa B
I κ B	– inibidores de κ B
IKK	– I κ B quinase
RNAP	– RNA polimerase
CoA	– coativadores
IFN- γ	– interferon-gamma
COEP	– Comitês de Ética e Pesquisa
UNESP	– Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho
FIGO	– Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
CBA	– do inglês <i>Cytometric Bead Array</i>
PPP	– plasma pobre em plaquetas
Lym	– linfócitos
Leu	– leucócitos
Neu	– neutrófilos
Mon	– monócitos
Ery	– eritrócitos
End	– endotélio
Plat	– plaquetas
ICAM-1	– molécula de adesão intercelular-1
NK	– do inglês: <i>Natural Killer</i>



Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do papel das micropartículas na progressão do câncer.....	27
Figura 2 – Representação esquemática da função do fator de transcrição nuclear Kappa B.....	28
Figura 3 – Representação esquemática da técnica de <i>Cytometric Bead Array</i>	36
Figura 4 – Exemplo de perfil dos níveis plasmáticos de quimiocinas através de microesferas de captura de mulheres com câncer de ovário por citometria de fluxo.....	38
 ARTIGO Distinct systemic inflammatory pattern in breast and ovarian cancer patients: comparative analysis of cytokines, chemokines and microparticles	
Figure 1 – Comparison of cytokines pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ), regulatory cytokines (IL-2, IL-10, IL-17a) and chemokines (CCL-2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) in control group, breast and ovarian cancer patients.....	57
Figure 2 – Comparison of circulating microparticles (MPs) between control group, breast and ovarian cancer patients according to their specific cellular origin..	58
Figure 3 – Biomarkers networks in control group (A), breast (B) and epithelial ovarian cancer (C) patients according to their specific cellular origin.....	59
Tabela 1 – Characteristics of the groups studied (control group, patients with breast cancer and patients with ovarian cancer)	60



Índice

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**LISTA DE FIGURAS**

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
6. Artigo - Distinct systemic inflammatory pattern in breast and ovarian cancer patients: comparative analysis cytokine, chemokine and microparticles.....	44
INTRODUCTION.....	45
PATIENTS AND METHODS.....	47
RESULTS.....	50
DISCUSSION.....	51
FIGURE AND TABLES LEGENDS.....	57
REFERENCES.....	61
7. CONCLUSÕES.....	67
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
9. ANEXOS.....	70

1. Introdução

O conhecimento da fisiopatologia das neoplasias de ovário e de mama é de grande importância para elucidação dos mecanismos envolvidos na origem e patogênese desses tumores. Numerosos fatores genéticos e não genéticos afetam a probabilidade de desenvolver câncer de mama e de ovário, como uma mutação hereditária nos genes supressores de tumor BRCA1/2. Sabe-se que os indivíduos portadores de mutações em BRCA1 e BRCA2 têm uma taxa de vida média acumulada de 44-78% e 31-56% para câncer de mama e 18-54% e 2,4-19% para o câncer de ovário, respectivamente, fazendo com que essas mutações sejam os preditores mais fortes de câncer de mama e de ovário [1].

O câncer de ovário constitui um grande desafio para a oncologia ginecológica, tendo em vista seu difícil rastreio e sua elevada letalidade quando o diagnóstico é tardio. Aproximadamente 1,3% das mulheres serão diagnosticadas com câncer de ovário em algum momento da vida. Nos EUA o número de novos casos de câncer de ovário foi de 11,7 por 100.000 mulheres/ano. O número de óbitos foi de 7,4 por 100.000 mulheres/ano. Estas taxas foram baseadas em casos e óbitos de 2010 a 2014. Em 2014 estimava-se que 222.060 mulheres viviam com câncer de ovário nos EUA, de acordo com *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) [2]. No Brasil estimaram-se 6.150 casos novos de câncer do ovário no ano de 2016, com um risco estimado de 5,95 casos a cada 100 mil mulheres [3].

A maioria dos tumores malignos de ovário é diagnosticada em estádios avançados devido a falta de sintomas específicos nos estádios iniciais e a falta de um rastreamento efetivo. Os marcadores tumorais e os exames de imagem apresentam altas taxas de resultados falsos positivos, especialmente quando realizados na pré-menopausa, e não são custo efetivos [4]. Essa elevada taxa de mulheres diagnosticadas em estádios avançados associa-se a uma sobrevida em cinco anos de aproximadamente 40-50% [5].

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres nos Estados Unidos. De acordo com a *American Cancer Society* (ACS), cerca de 252.710 mortes por câncer de mama são esperadas em 2017 nos Estados Unidos. Para o Brasil, em 2016, foram estimados 57.960 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres [3]. Estudos anteriores sugeriram que a detecção precoce do câncer de mama com tratamento adequado poderia reduzir significativamente as taxas de mortalidade por câncer de mama a longo prazo [6]. Embora tenha ocorrido alguma redução do risco com o rastreamento, as taxas de óbitos continuam altas, especialmente nos países em

desenvolvimento. Isso provavelmente acontece devido ao diagnóstico ainda se dar em estágios avançados da doença [4]. A detecção precoce do câncer de mama com o objetivo de melhorar os resultados e a sobrevida das pacientes continua a ser uma prioridade. A identificação de novos biomarcadores podem propiciar um manejo mais adequado e permitir um melhor entendimento do mecanismo molecular do câncer de mama e suas metástases.

Durante muitos anos o papel do sistema imune no combate ao câncer foi bastante controverso, assim como a possível exploração do sistema imune para tratamento dessa doença. No entanto, com os recentes sucessos de imunoterapia contra o câncer está claro que manipulações profiláticas e terapêuticas do sistema imune são abordagens chave para o tratamento e prevenção da doença. Sabe-se que a morte celular e a instabilidade genômica que ocorre em células tumorais podem levar à localização do DNA pelo sistema imune. Os mecanismos são diversos, mas são unidos pela idéia comum de que as interrupções da fisiologia celular normal podem ser detectadas pelo sistema imunológico. Os tumores podem transportar um grande espectro de proteínas mutadas que podem ser detectadas como antígenos. Além disso, auto-proteínas não mutáveis também podem ser objeto de reconhecimento "autoimune" no contexto do câncer. Processos como fagocitose, morte celular, comunicação célula-célula, migração celular, extravasamento celular, desenvolvimento de microambientes imunológicos e supressão e evasão do sistema imune têm relevância direta para o câncer. No entanto, o processo imunológico mais relevante para tumores é quase certamente a inflamação, um estado fisiológico complexo que surge durante uma resposta imune [7].

A importância da resposta inflamatória na etiologia e patogênese do câncer tem sido descrita desde o século XIX, através dos trabalhos de Rudolf Ludwig Karl Virchow, que sugeriu que o infiltrado "linfocitário" refletia a origem do câncer em sítios de inflamação crônica (*Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*, 1858). No entanto, o efeito paradoxo do infiltrado inflamatório na contenção e na progressão tumoral ainda é pouco compreendido [8]. Vários estados patológicos, como infecção persistente ou deficiência imunológica, podem levar à inflamação crônica, resultando em lesão tecidual e carcinogênese [9]. A maioria das células tumorais secreta citocinas e quimiocinas, especialmente como consequência às mutações oncogênicas e às alterações de sinalização no sítio tumoral. Essas moléculas são potentes mediadores e reguladores da inflamação [10].

As citocinas são secretadas principalmente por linfócitos e macrófagos e atuam alterando a função das células alvo de forma parácrina, autócrina ou endócrina (menos comumente). As citocinas têm várias características estruturais e funcionais comuns. Elas são polipéptideos glicosilados, são biologicamente ativos em concentrações muito baixas, exercem os seus efeitos ligando-se aos receptores na superfície da célula alvo, são pleiotrópicas e seus efeitos são aditivos, sinérgicos ou antagônicos. Portanto, é a integração desses efeitos que determina o resultado geral. Além disso, deve-se lembrar que é a rede de citocinas múltiplas que medeia o mesmo efeito [11].

Uma série de estudos sugerem que fatores relacionados à inflamação do epitélio da superfície ovariana, como ovulação, endometriose e doenças inflamatórias pélvicas estão associados a um risco aumentado de câncer epitelial de ovário (CEO). O processo de ovulação é acompanhado por formação de cistos de inclusão ovariana contendo células epiteliais de superfície. Devido à localização específica das células epiteliais do ovário na cavidade peritoneal, elas são claramente expostas a vários agentes pró-inflamatórios. Essas células também são expostas a vários agentes autócrinos e parácrinos, como hormônios, fosfolipídios eicosanóides e citocinas, que exercem estresse e causam danos. Mediadores inflamatórios e várias citocinas produzidas por células imunes inatas ativadas, como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 mostraram promover a gênese, o crescimento e a progressão do CEO. A maioria dos estudos sobre o papel da inflamação se concentram na sinalização de IL-6, que parece desempenhar o papel principal com ação imunorreguladora no microambiente do CEO [9].

Como em outras doenças malignas, destaca-se o papel desempenhado pelos constituintes do microambiente tumoral no câncer de mama, com destaque para os mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. As quimiocinas podem afetar o curso da doença de várias maneiras, promovendo ou inibindo o crescimento tumoral e a formação de metástases. Em pacientes com câncer de mama, a expressão de níveis plasmáticos de várias citocinas parece estar associada a um subgrupo de alto risco de pacientes com menores taxas de sobrevida em comparação com os pacientes que apresentam baixos níveis de citocinas, podendo então ser utilizadas como biomarcadores de fator prognóstico da doença [12, 13].

Especificamente no câncer de mama, as pesquisas se concentraram nas quimiocinas inflamatórias CCL2 e CCL5. Essas quimiocinas são bem reconhecidas devido às suas

atividades no contexto imune, onde induzem motilidade dirigida por leucócitos. Atuando principalmente em reações inflamatórias, essas duas quimiocinas estimulam a migração principalmente de monócitos e células T para locais danificados ou infectados [14]. Em contraste certas citocinas promovem a geração e/ou eficácia de agentes antitumorais, incluindo células dendríticas e linfócitos NK, causando inibição do crescimento tumoral ou, em certos casos, regressão. Além dos seus efeitos sobre o sistema imunológico, as citocinas também influenciam a atividade da aromatase e a síntese de estrogênio na vizinhança do tumor promovendo o crescimento e a agressividade do mesmo [11].

As micropartículas (MPs) fazem parte de um grupo de vesículas extracelulares denominadas microvesículas (MVs), que inclui uma população de vesículas membranosas heterogêneas variando entre si em forma e tamanho (0,1 a 1 μm). Outras vesículas extracelulares incluem corpos apoptóticos e exosomas, que diferem em tamanho e origem. As MPs são liberadas da membrana celular pelo processo de brotamento da membrana externa através da perda de assimetria da membrana fosfolipídica e rearranjo do citoesqueleto. Portanto, as MPs são compostas de fragmentos da célula-mãe, compreendendo proteínas da membrana plasmática e constituintes citoplasmáticos e nucleicos da célula original. Assim que as MPs se originam, elas são liberadas para a circulação sistêmica, servindo como meios de comunicação intercelular. As MPs carregam várias moléculas bioativas, como proteínas e ácidos nucleicos, incluindo micro RNA (miRNA). Dessa forma, elas estão envolvidas em múltiplos aspectos da progressão do câncer, incluindo o desenvolvimento de resistência a medicamentos, metástases, angiogênese tumoral (pela disseminação de componentes como esfingomiélin e fator de crescimento vascular endotelial - VEGF), sobrevivência celular e evasão da imunovigilância do sistema imune pela expressão de componentes como uma proteína de membrana latente (LMP-1) e ligante Fas (Figura 1 e Figura 2) [14].

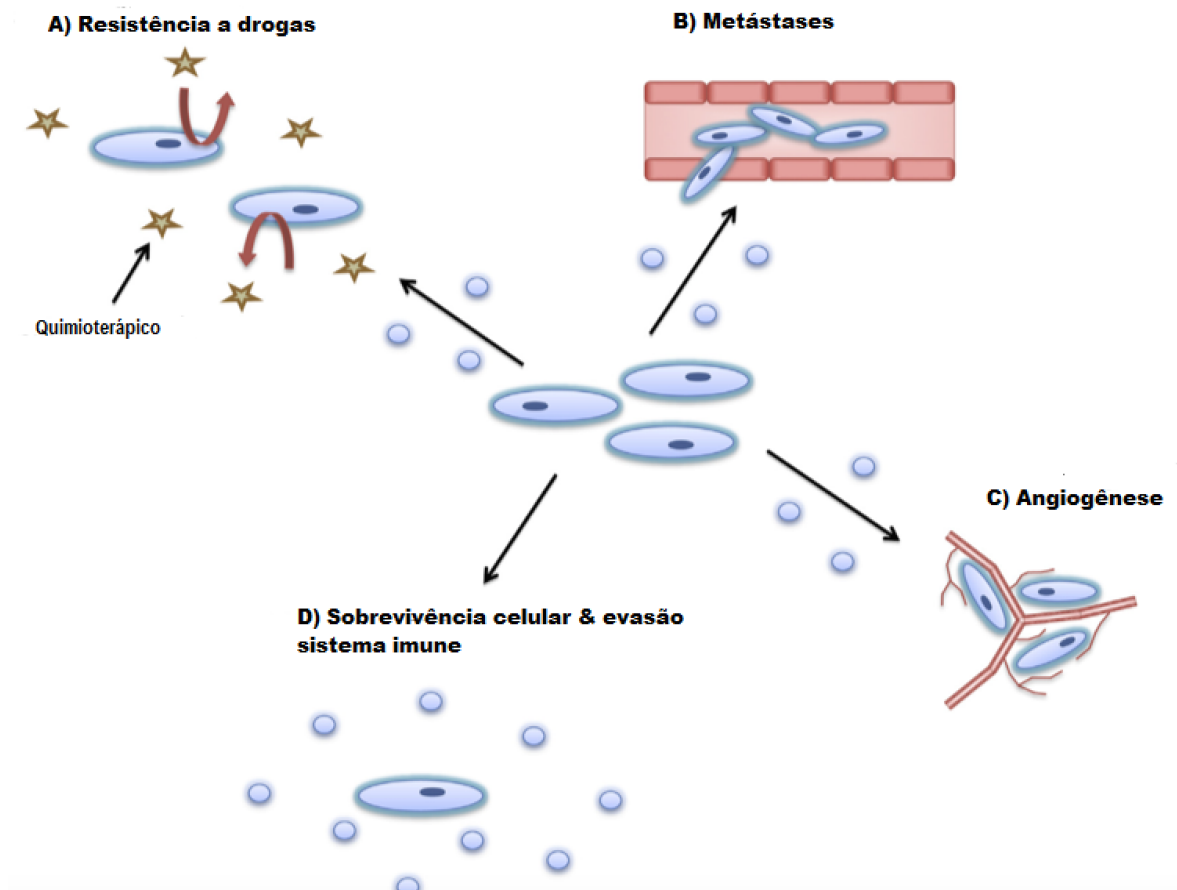


Figura 1 – Representação esquemática do papel das micropartículas na progressão do câncer.

Nota: Adaptado do artigo *Microparticles in cancer: A review of recent developments and the potential for clinical application*, de Gong, J., et al.

As MPs facilitam (A) o desenvolvimento da resistência aos fármacos por meio da expressão de proteínas como P-gp e MRP-1, (B) o aumento do potencial metastático habilitado pela aquisição de proteases, miRNAs e proteína tirosina quinase, (C) promoção da angiogênese pela disseminação de componentes como esfingomielina e VEGF e (D) sobrevivência celular e evasão da imunovigilância do sistema imune através da expressão de componentes como caspase 3, proteína de membrana latente (LMP-1) e ligante Fas.

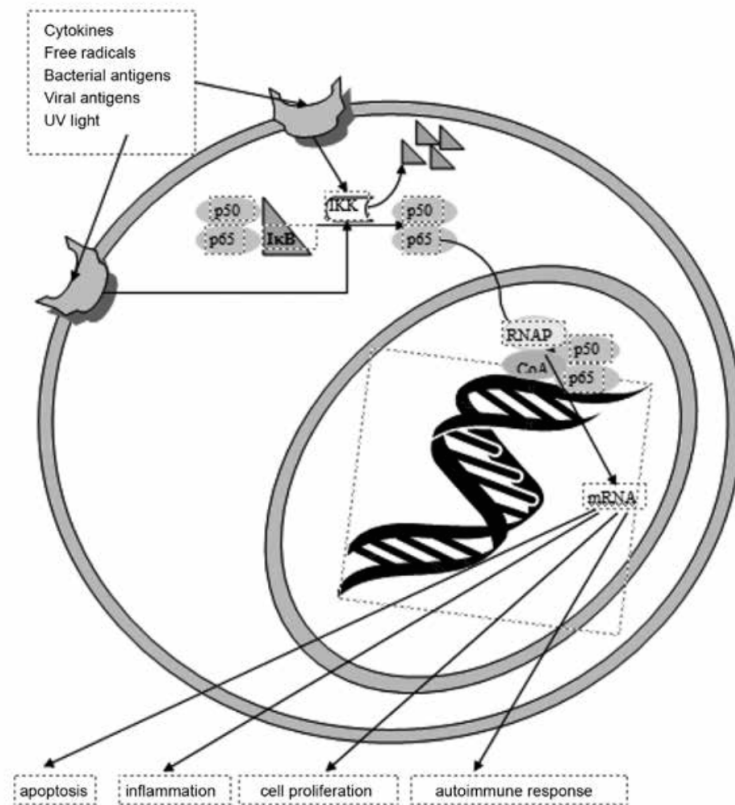


Figura 2 – Representação esquemática da função do fator de transcrição nuclear *Kappa B*.

Nota: Adaptado do artigo *Inflammation and ovarian cancer--current views*, de Kisielewski, R., et al.

Fator nuclear de transcrição *kappa B* (NF- κ B) é um complexo protéico que controla a transcrição do DNA e desempenha um papel importante na inflamação, resposta auto-imune, apoptose e proliferação celular. NF- κ B pode ser encontrado no citoplasma de quase todas as células eucarióticas, ligado a proteínas reguladoras chamadas inibidores de κ B (I κ B). A estimulação de células leva à degradação proteolítica de I κ B pela enzima I κ B quinase (IKK) e, portanto, ativação de NF- κ B. Após a translocação para o núcleo, NF- κ B forma um complexo com RNA polimerase (RNAP), coativadores (CoA) e DNA. Esse complexo leva à transcrição de DNA para mRNA.

Existem evidências emergentes do papel das MPs no monitoramento e diagnóstico de doenças, servindo como biomarcadores para o câncer. Elas demonstraram capacidade de incorporar componentes da célula original e carregá-los às células receptoras, contribuindo para progressão e resistência ao câncer. É essa capacidade que faz das MPs um biomarcador promissor para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da doença. As MPs circulantes foram detectadas no sangue, na urina e no líquido ascítico de pacientes com câncer [14].

2. Justificativa do Estudo

A presença de MPs derivadas do câncer e de células de sua resposta inflamatória pode servir como nova fonte de informação sobre a fisiopatologia desta doença, assim como agir como possível biomarcador para rastreio, diagnóstico e prognóstico dos tumores de ovário. Está claro que as MPs são capazes de modular direta ou indiretamente o comportamento das células ao seu redor, especialmente através do transporte de proteínas e ácidos nucleicos [15]. Além disso, os níveis de citocinas e quimiocinas podem representar um reflexo do estado de imunidade da paciente e servir como biomarcadores para prever o prognóstico dessas mulheres, além de se constituírem como ferramentas complementares potenciais na sua monitoração pós-terapêutica.

Dessa forma, medir a concentração plasmática de citocinas, quimiocinas e MPs em mulheres com essas neoplasias é uma maneira pouco invasiva e indireta de se avaliar a resposta inflamatória/reguladora sistêmica associada e o papel do microambiente formado na resposta pró e antitumoral do hospedeiro. O estudo de biomarcadores da inflamação pode propiciar maior compreensão sobre o comportamento biológico desses tumores, assim como sinalizar para futuros biomarcadores de atividade da doença e de sua monitoração terapêutica. Além disso, a descoberta de novos biomarcadores pode ser útil para determinar a escolha da imunoterapia mais adequada para cada grupo de pacientes, possibilitando a seleção de pacientes para novas estratégias terapêuticas.

Com esse objetivo, esse estudo visa comparar o perfil da resposta inflamatória sistêmica dos cânceres de ovário e de mama, duas doenças sabidamente relacionadas geneticamente através dos genes BRCA1/BRCA2. Essa comparação se deu por meio da dosagem de citocinas, quimiocinas e MPs, a fim de avaliar se há ou não diferença nessa resposta inflamatória sistêmica de ambos.



3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Comparar o perfil da resposta inflamatória sistêmica nos cânceres de ovário e de mama.

3.2 Objetivos Específicos

1. Comparar os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas (IL-1- β , IL-2, IL-6 IL-10, IL-12, IL-17a, TNF, interferon-gamma (IFN- γ), CXCL8, CXCL-9, CXCL 10, CCL 2, CCL5) em mulheres com câncer de mama e de ovário.
 2. Comparar os níveis plasmáticos de micropartículas (neutrófilos, leucócitos, monócitos, eritrócitos, endotélio, plaquetas, linfócitos) em mulheres com câncer de mama e de ovário.
 3. Construção de redes para mostrar as correlações entre os biomarcadores em cada câncer (mama e ovário) e no grupo controle para avaliação do perfil de resposta inflamatória em cada um deles.
-

4. Metodologia

➤ Pacientes

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP) e do Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todas as pacientes.

Este estudo envolveu 94 mulheres: 30 mulheres saudáveis (grupo controle), 26 mulheres com câncer epitelial de ovário e 38 mulheres com câncer de mama. Estas mulheres foram pacientes cadastradas no Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Elas responderam um questionário com perguntas clínicas e epidemiológicas e outros dados clínicos foram obtidos de seus prontuários.

Foram selecionadas pacientes com suspeita de câncer de mama ou de ovário, para propedêutica e diagnóstico. O sangue das pacientes utilizado no estudo foi coletado no momento da indução anestésica, no pré-operatório imediato. Os critérios de exclusão comuns aos dois grupos foram tratamento prévio com quimioterapia ou radioterapia, hipertensão, coagulopatias, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares/autoimunes/renais e/ou doenças crônicas em uso de anti-inflamatórios não esteróides, corticóides ou imunossupressores nos três meses anteriores ao estudo.

➤ Técnica Cirúrgica

As mulheres com CEO foram submetidas à laparotomia mediana ampla, inventário da cavidade peritoneal, lavado peritoneal, histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral, omentectomia, linfadenectomia pélvica e para- aórtica quando indicada, além dos procedimentos necessários à realização de citorredução ótima, quando possível (ressecção intestinal, hepatectomia parcial, apendicectomia, peritonietomia, dentre outros).

As mulheres com câncer de mama foram submetidas a biópsia da lesão por *core-biopsy* ou biópsia incisional peroperatória ou biópsia excisional, de acordo com cada caso.

➤ Avaliação Histológica

As peças cirúrgicas retiradas foram fixadas em formaldeído 10%. O material foi identificado e encaminhado para avaliação anatomo-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 (2x 60 min.) e em parafina 60°(2x 60 min.) e incluídas em bloco de parafina. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina eosina (HE), sendo o tipo histológico, o grau de diferenciação tumoral e a presença de metástases classificados de acordo com a FIGO [16].

➤ Detecção do nível de citocinas/ quimiocinas plasmáticas por citometria de fluxo

Amostras de sangue periférico foram coletadas a vácuo em tubos de 10 ml contendo heparina sódica (Vacutainer – BD, E.U.A.) no pré-operatório, antes da indução anestésica. Os tubos foram centrifugados a 400g por 40 minutos a 18°C (Centrífuga Beckman Modelo j-6b, E.U.A) e, após a centrifugação, o plasma obtido foi aliquoteado e mantido a -20°C até a realização dos experimentos.

Os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas foram quantificados utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) (Becton Dickinson-BD) (Figura 3), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas que são detectadas no canal de fluorescência 3 (FL-3). Essa metodologia permite a avaliação simultânea de várias citocinas e quimiocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostras plasmáticas.

Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada dos protocolos originais propostos por Chen et al. 1999, como descrito a seguir [17]:

Alíquotas de 25mL de plasma diluído 1:5 com diluente G (reagente do kit CBA), alíquotas de 25mL dos padrões de citocinas/ quimiocinas, submetidos à diluição seriada com diluente G (“Top Standard” – 2500 pg/mL, 1:2 – 1250 pg/mL, 1:4 – 625 pg/mL, 1:8 – 312.5 pg/mL, 1:16 – 156 pg/mL, 1:32 – 80 pg/mL, 1:64 – 40 pg/mL, 1:128 – 20 pg/mL e 1:256 – 10 pg/mL) e 25mL de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon – BD, E.U.A). Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 15mL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais selecionados para a avaliação (anti- IL-1, IL-2, IL-6 IL- 10, IL-12, IL- 17a, TNF, IFN- gamma, CXCL8, CXCL-9, CXCL 10, CCL 2, CCL5), com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500mL da solução F (“Wash buffer”, 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 20mL do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti- citocinas/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 500mL 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 250mL de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

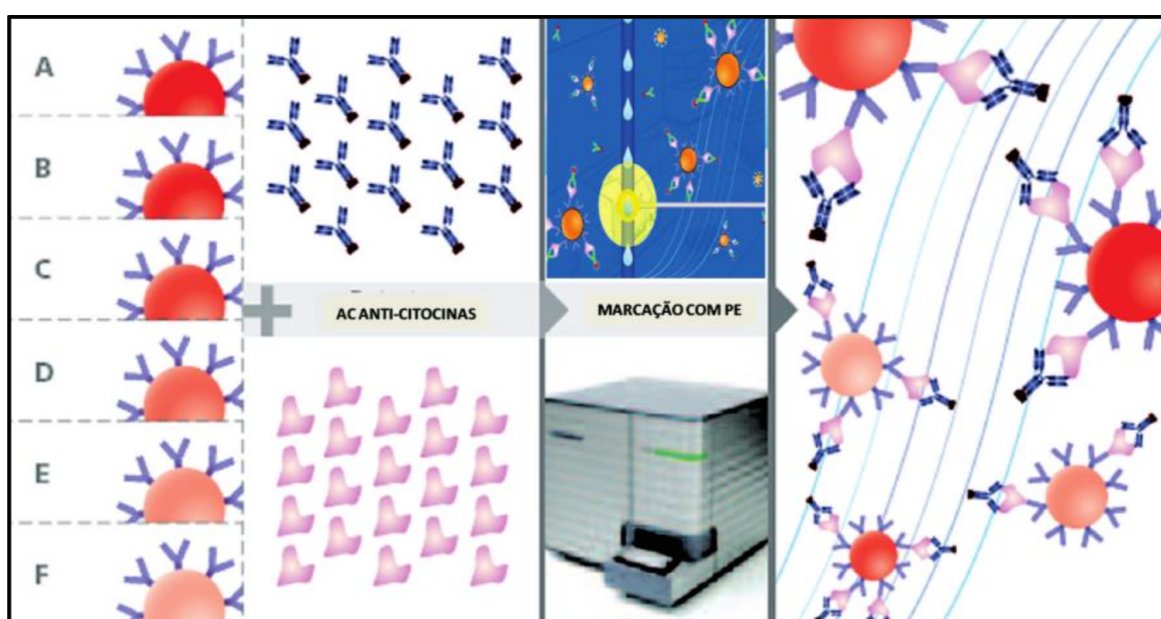


Figura 3 – Representação esquemática da técnica de *Cytometric Bead Array*..

Nota: Adaptado do bulário do *Cytometric Bead Array Flex Set System BD- Biosciences*, 2004-2005. Com micro-esferas marcadas, foram adicionados aos anticorpos anti-citocinas/quimiocinas, amostras de plasma. Em seguida, a amostra foi marcada por imunofluorescência (ficoeritrina) e analisada no citômetro de fluxo. Os resultados foram obtidos por software específico para CBA (*FCAP Array TM Software, BD, Pharmingen, EUA*). Os anticorpos utilizados foram anti: IL-1, IL-2, IL-6 IL-10, IL-12, IL- 17A, TNF, IFN- gamma, CXCL8, CXCL-9, CXCL 10, CCL 2, CCL5. Ac: Anticorpos; PE: Ficoeritrina

➤ Aquisição e análise dos dados de citocinas e quimiocinas plasmáticas por citometria de fluxo

A aquisição dos dados obtidos foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur®(BD). Embora as esferas fluorescentes presentes no kit CBA sejam projetadas para serem excitadas com o laser de argônio (488nm), com emissão em comprimento de onda correspondente ao parâmetro Fluorescência 3 (FL-3), elas também podem ser excitadas pelo “red diodo laser”, com emissão de fluorescência detectadas no canal Fluorescência 4 (FL-4). Esta possibilidade de leitura pode ser obtida durante o processo de aquisição através da utilização do “Dual Laser CBA Template”, que simplifica os ajustes do equipamento, reduzindo a necessidade de compensações da interferência que a fluorescência emitida pelas esferas possa exercer sobre a fluorescência inerente aos anticorpos monoclonais anti-citocinas/quimiocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2). 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) (Figura 4). Para a análise dos dados, inicialmente as microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura correspondentes a cada citocina/quimiocina foram segregadas em gráficos de distribuição puntual FL-4 x FL-2, onde as cinco esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL-4). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL-2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada citocina/quimiocina presente na amostra. Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa de citocinas/quimiocinas plasmáticas, uma curva padrão foi construída utilizando os dados dos padrões de citocinas/quimiocinas em concentrações conhecidas (10 pg/mL – 2500 pg/mL) e empregada para determinar as concentrações de cada citocina /quimiocina no plasma teste. Um modelo de ajustamento através da curva do 5o 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.

➤ Obtenção do plasma livre de plaquetas

Amostras de sangue total coletadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio foram submetidas à centrifugação (600 x g) por 15 minutos à TA para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP foi novamente centrifugado por 3 min (13.000 x g) a 4°C para obtenção do plasma livre de plaquetas (PLP) que foi armazenado a -70°C até o momento do uso.

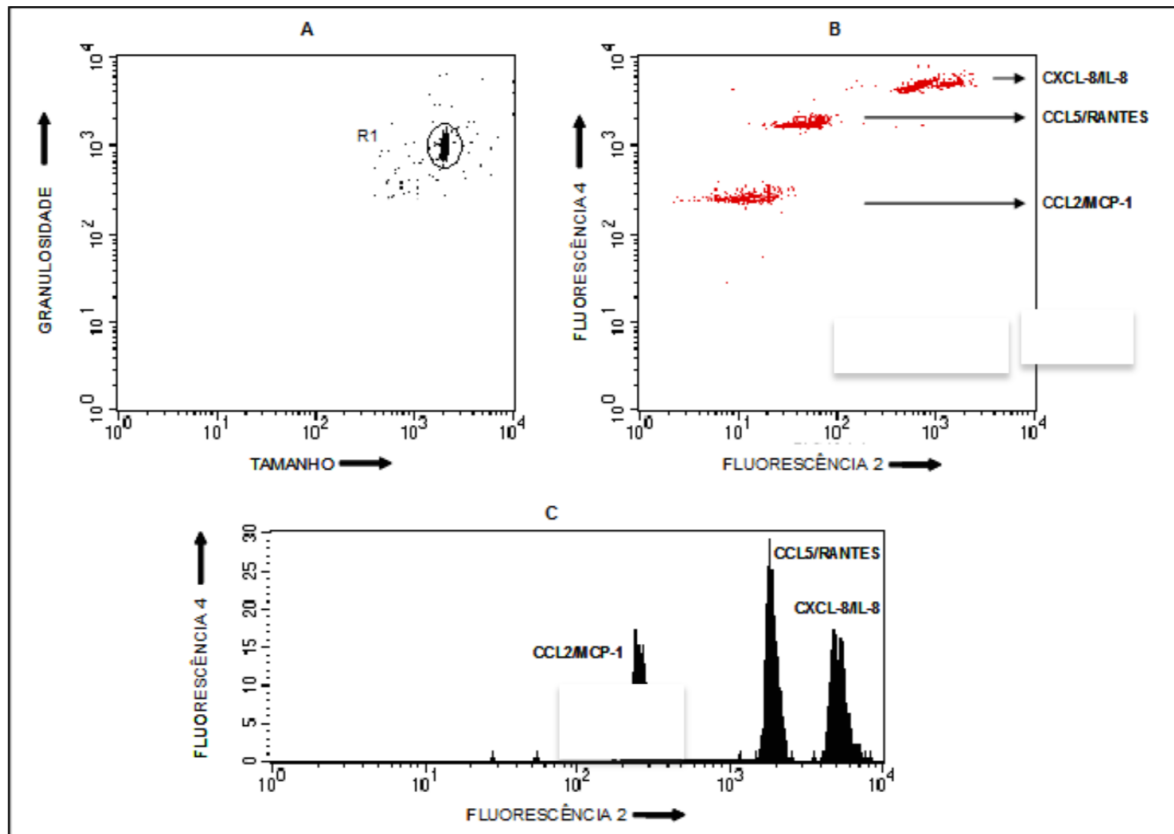


Figura 4 – Exemplo de perfil dos níveis plasmáticos de quimiocinas através de microesferas de captura de mulheres com câncer de ovário por citometria de fluxo.

(A) Determinação da região da população de microesferas através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). (B) Deslocamento das microesferas, ao longo do eixo X (FL-2) em gráficos de distribuição puntual FL-2 versus FL-4, proporcional à concentração de cada quimiocina presente nos plasmas avaliados. (C) Histograma das microesferas ao longo do eixo X (FL2) em gráficos de distribuição puntual Fluorescência 2 versus Fluorescência 3, proporcional à concentração de cada quimiocina presente nos plasmas avaliados.

➤ Obtenção das micropartículas (MPs)

A quantificação das MPs no plasma foi realizada pela citometria de fluxo adaptada dos protocolos descritos anteriormente [17].

Cem microlitros do PLP foram diluídos em solução de PBS contendo citrato e heparina (1 µg/mL) (diluição de 1:3) e novamente centrifugados por 90 minutos a 14.000 x g a 15°C. O sedimento rico em MPs foi ressuspensão no tampão de ligação à anexina 1X (BD Biosciences, Calipornia, US). As MPs foram quantificadas por citometria de fluxo através da calibração com “microbeads” fluorescentes (Spherotech Inc.Libertyville, Illinois, US) de tamanho definido (0,7 a 0,9 µm). Dez microlitros das “beads” foram adicionados à 100 µL de PBS 1X estéril.

➤ Identificação de micropartículas (MPs) pela Citometria de fluxo Análise fenotípica das MPs por citometria de fluxo

A maioria dos reagentes utilizados neste estudo foi obtida da empresa *BD Biosciences*, exceto quando mencionado. A caracterização fenotípica das MPs para determinação de sua origem celular foi realizada com a incubação de 100 µL do plasma contendo as MPs com os anticorpos específicos para: neutrófilos (CD66/PE), linfócitos T (CD3/PE), plaquetas (CD41a/PerCP), leucócitos (CD45/APC), monócitos (CD14/PerCP), eritrócitos (CD235a/PECy5) e células endoteliais (CD51/61/PE). Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 min protegidas da luz. As MPs foram ressuspensas em 100 µL do tampão de ligação de Anexina V (BD Pharmingen) e, finalmente, 5 µL de Anexina V/FITC foram adicionados, já que a Anexina V reconhece resíduos de fosfatidilserina que geralmente estão presentes na superfície das MPs.

As amostras foram levadas ao citômetro de fluxo LSR-Fortessa (Becton Dickson - BD, E.U.A.), onde cerca de 100.000 eventos foram obtidos em cada amostra, sendo pelo menos 2.000 eventos dentro da região específica para MPs. As análises foram feitas utilizando o *software FlowJo (Tree Star)*, onde foram construídos *dot plots* de todos os marcadores utilizados versus Anexina/FITC, permitindo assim a identificação e quantificação de cada população de MPs específica.

Como as MPs possuem um tamanho de cerca de 1 μm , utilizou-se microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7 - 0,9 μm) para delimitar a região (R1) correspondente às MPs. As MPs isoladas do plasma foram então definidas de acordo com o tamanho (FSC) e a granulidade (SSC) (Figura 5A). Além disso, utilizou-se a proteína ligadora de fosfolípedes Anexina V (capaz de reconhecer fosfatidilserinas presentes na superfície das MPs) conjugada com fluoresceína - FITC.

➤ Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os testes de Shapiro-Wilk foram utilizados para verificar se as variáveis eram normalmente distribuídas. Os dados não paramétricos foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunns. Variáveis não normais foram apresentadas como intervalo mediano e intercuartil (percentis 25 a 75). As correlações foram analisadas usando o teste de 2 lados do Spearman. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,005$.

Redes com as dosagens de citocinas, quimiocinas e micropartículas foram construídas para avaliar a associação entre tais dosagens em cada grupo. As correlações foram classificadas em negativas e positivas e fracas, moderadas e fortes. As linhas pontilhadas representam as correlações negativas e as linhas contínuas as positivas. A força da correlação é representada pela cor das linhas – quanto mais escura a linha, mais forte a correlação.

O teste de correlação de Sperman foi usado para avaliar a associação entre os níveis dos biomarcadores. Correlações positivas e negativas foram significantes quando $p < 0,05$. O índice de correlação (r) foi usado para categorizar a força da correlação como fraca ($r < 0$), moderada ($0,36 > r > 0,67$) e forte ($r > 0,68$). O *software Graphpad Prism 5.00* (San Diego, USA) foi usado para a análise das correlações e o *Cytoscape* (versão 3.0.2) usado para a construção das redes de interações biomoleculares.

5. Referências Bibliográficas

1. Guindalini, R.S., et al., *Genetic anticipation in BRCA1/BRCA2 families after controlling for ascertainment bias and cohort effect*. Cancer, 2016. **122**(12): p. 1913-20.
2. Institute, N.C. *SEER Stat Fact Sheets: Ovarian Cancer*. 2017 [cited 2017 07/12/2017]; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
3. INCA. *Incidência de câncer no Brasil*. 2016 [cited 2017 26/09/2017]; Available from: www.inca.gov.br.
4. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
5. Reis FM, S.F.A., Triginelli SA, Camargos AF, *Biochemical markers of ovarian cancer: diagnostic and prognostic value*. Italian Journal of Gynaecology & Obstetrics, 2004. **16**(3): p. 5.
6. Wang, L., *Early Diagnosis of Breast Cancer*. Sensors (Basel), 2017. **17**(7).
7. Vance, R.E., et al., *Listening to each other: Infectious disease and cancer immunology*. Sci Immunol, 2017. **2**(7).
8. Kurman, R.J. and M. Shih le, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. **42**(7): p. 918-31.
9. Kisielewski, R., et al., *Inflammation and ovarian cancer--current views*. Ginekol Pol, 2013. **84**(4): p. 293-7.
10. Ayantunde, A.A. and S.L. Parsons, *Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study*. Ann Oncol, 2007. **18**(5): p. 945-9.
11. Rao, V.S., et al., *Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review)*. Oncol Rep, 2006. **15**(1): p. 179-85.
12. Tripsianis, G., et al., *Coexpression of IL-6 and TNF-alpha: prognostic significance on breast cancer outcome*. Neoplasma, 2014. **61**(2): p. 205-12.
13. Lyon, D.E., et al., *Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy*. Nurs Res, 2008. **57**(1): p. 51-8.
14. Gong, J., et al., *Microparticles in cancer: A review of recent developments and the potential for clinical application*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 35-40.
15. Tarnok, A., et al., *Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum*. Clin Chem, 2003. **49**(6 Pt 1): p. 1000-2.
16. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. **124**(1): p. 1-5.
17. 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.



6. Artigo

Distinct systemic inflammatory pattern in breast and ovarian cancer patients:
comparative analysis of cytokines, chemokines and microparticles

The knowledge of the carcinogenesis of ovarian and breast cancers is of great importance to elucidate the mechanisms involved in the origin and pathogenesis of these tumors. The ovarian cancer is a great challenge for gynecological oncology, due to its difficult screening and high lethality when diagnosed late. Approximately 1.3 percent of women will be diagnosed with ovarian cancer at some point during their lifetime. In 2014 it was estimated that 222,060 women were living with ovarian cancer in the USA (1).. Tumor markers and imaging tests have high rates of false positive results, especially when performed in the premenopausal period, and are not cost effective (2).

Breast cancer is the most common malignant neoplasm and the leading cause of death related to malignant tumors in women worldwide (3). Early detection of breast cancer with adequate treatment could significantly reduce long-term breast cancer mortality rates (4). Although some risk reduction has occurred with screening, death rates remain high, especially in developing countries. This probably happens because the diagnosis still occurs in advanced stages of the disease (5). Early detection of breast cancer with the goal of improving patient outcomes and survival remains a priority. The identification of new biomarkers can provide a better management and allow a better understanding of the molecular mechanism of breast cancer and its metastases.

The paradoxical effect of the inflammatory infiltrate on tumor containment and progression is still poorly understood (6). Most tumor cells secrete cytokines and chemokines, especially as a consequence of oncogenic mutations and changes in signaling at the tumor site. These molecules are potent mediators and regulators of inflammation (7). Cytokines are small polypeptides released from cells to regulate the activities of other cells via interactions with specific cytokine receptors expressed on their surface (8). Inflammatory mediators and various cytokines produced by activated innate immune cells have been shown to promote the genesis, growth and progression of EOC (9,10). In breast cancer, the profile of immune and inflammatory responses may provide important information for the prognosis and treatment of patients (11). As in other malignancies, the role played by the constituents of the tumor microenvironment in breast cancer stands out, with emphasis on inflammatory mediators such as cytokines and chemokines. Chemokines can affect the course of the disease in a number of ways, promoting or inhibiting tumor growth and metastasis formation (12). The coexpression of plasmatic levels of some cytokines seems to

be associated with a high risk of decreased survival and death when compared to breast cancer patients with lower levels of cytokines (13).

Microparticles (MPs) are part of a group of extracellular vesicles called microvesicles (MVs), which includes a population of heterogeneous membranous vesicles varying in shape and size (0.1 to 1 μm) (14). They present similar phenotypic expressions to the cells of origin and carry various substances such as proteins, enzymes, receptors and growth factors, cytokines and chemokines, lipids and nucleic acids (mRNA, miRNA and genome DNA) (15). They are involved in multiple aspects of cancer progression, including the development of drug resistance, metastasis, tumor angiogenesis, cell survival and evasion of immune surveillance (14). Currently MPs are considered to be powerful tools in the cellular communication network (16, 17). Recent studies suggest a possible clinical relevance of MPs derived from circulating cells in different malignant neoplasms, however, its role as tumor markers is still unknown (18). There is emerging evidence of the role of MPs in monitoring and diagnosing diseases, serving as biomarkers for cancer. They demonstrated the ability to incorporate components of the original cell and carry them to the recipient cells, contributing to progression and resistance to cancer. It is this capacity that makes MPs a promising biomarker for the diagnosis, prognosis and follow-up of the disease. Circulating MPs were detected in the blood, urine and ascitic fluid of cancer patients (14).

Thus, measuring the plasmatic concentration of cytokines, chemokines and MPs in women with cancer is a noninvasive and indirect way of evaluating the associated inflammatory/regulatory systemic response and the role of the microenvironment formed in the pro and antitumor response of the host. In addition, the study of biomarkers of inflammation may provide greater insight into the biological behavior of these tumors, as well as signaling to future biomarkers of disease activity and its therapeutic monitoring. Despite the similarity of some clinical features of EOC and breast cancer, there are marked differences in the pattern of inflammation and immune response, with different inflammatory cells recruited, different mediators produced, distinct consequences of inflammation and differing responses to therapy. Therefore, the aim of this study is to compare the profile of the systemic inflammatory response of ovarian and breast cancers through the measurement of cytokines, chemokines and MPs, in order to evaluate whether or not there is a difference in this systemic inflammatory response pattern.

PATIENTS AND METHODS

Ninety-four women with no evidence of malignancy (n= 30), breast cancer (n= 38) and epithelial ovarian cancer (n=26) were prospectively evaluated. The Ethics Committees of Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” and of Hospital Vera Cruz of Belo Horizonte approved this study and an informed signed consent was obtained from all participants. The patients answered a questionnaire encompassing clinical and epidemiological variables, and other clinical data were obtained from their medical records. The study included women with no evidence of malignancy or gynecological diseases (control group), patients with breast cancer and proposed to surgical treatment and patients with EOC and proposed to debulking surgery. The exclusion criteria included previous treatment with chemotherapy and/or radiotherapy; diagnosis of diseases of the immune system and/or use of corticosteroids or immunosuppressive drugs within the past 6 months; presence in laparotomy of any acute infectious process; identification of distinct malignancy from EOC in the histopathological examination of the surgical specimen. In EOC group, histological grading and disease staging were based on the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification (19).

Purification of MPs from plasma

The quantification of MPs in plasma was performed by flow cytometry. Briefly, Citrated blood (0.5 mL) was centrifuged at $1,500 \times g$ for 15 min, and plasma was then cooled to -20°C before storage at -80°C . Samples were further centrifuged at $13,000 \times g$ for 3 min to obtain platelet-free plasma. The latter was diluted 1:3 in citrated PBS containing heparin and centrifuged at $14,000 \times g$ for 90 min at 15°C . The resultant MP pellet was then resuspended in $1 \times$ annexin V binding buffer (BD Biosciences, California, US).

Detection of plasmatic MPs

Unless otherwise stated, all reagents and mAbs used in the Flow cytometry experiments were provided from BD Biosciences. MPs isolated from plasma were gated (R1) based on their forward (FSC) and side (SSC) scatter distribution in density plots as

compared to the distribution of synthetic 0.7 – 0.9 μm SPHERO™ Amino Fluorescent Particles (Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, US). Taking into account the presence of phosphatidylserine (PS) residues in MPs surface, events present in R1 were accessed for their positive staining for annexin V (BD Bioscience) – a classical marker for microparticles – using PE-conjugated monoclonal antibodies (mAbs). Mouse IgG PE conjugated isotype control mAbs were used to properly place gates. Annexin V⁺ events gated on R2 region were further assessed for immunolabeling with FITC-conjugated mAbs against the cell markers CD66 (neutrophils), CD41a (platelets), CD51 (endothelial cells), CD235a (erythrocytes), CD45 (leukocytes), CD3 (lymphocytes), and CD14 (monocytes) or the correspondent mouse IgG FITC-conjugated isotype control mAbs. The samples were analyzed in a Flow Cytometry FACSCalibur (Becton-Dickinson, California, US). Over 100,000 events were acquired on each sample, to reach at least 2,000 events within the MPs gate.

Detection of plasmatic cytokine/chemokine levels by cytometric bead array immunoassay (CBA)

The secreted cytokine/chemokine analysis by flow cytometry is a methodology in which the simultaneous measurement of multiple biomarkers in a single sample is performed (15, 20, 21). For plasma biomarkers determination, whole blood samples were collected using sodium heparin (Vacutainer-BD, U.S.A.) as the anti-coagulant. Plasma was maintained at – 80°C in aliquots thawed just before use. The CBA immunoassay kit (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used for quantitative analysis of plasma biomarkers levels. The CBA kit uses 7.5 μm polystyrene microbeads, consisting of distinct populations, unique on their type 3 fluorescence intensity (FL-3) each coupled to monoclonal antibody (MoAb) against one of the biomarkers IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17a, TNF α , IFN-gamma, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, CCL-2, CCL-5 to capture a given via direct immunoassay using a cocktail of different MoAbs coupled to phycoerythrin (PE) (FL-2). Briefly, 25 μl of plasmas or standards (previously diluted in diluent G, as recommended by the manufacturer) were added to 15 μl of a bead cocktail, and incubated for 90 min at room temperature in the dark. The biomarkers standard calibrator mixture was used for each assay. After incubation, the samples and standards were washed with 500 μl of wash buffer (supplied with CBA kit) and centrifuged at 600 g for 7 min at

room temperature. Subsequently, 20 µl of detection cocktail consisting of six PE-conjugated MoAbs were added to each tube, and the mixture re-incubated for 90 min at room temperature in the dark. Following incubation, the samples and standards were washed again with 500 µl of wash buffer and centrifuged at 600 g for 7 min at room temperature to remove unbound detector reagent. After washing, 250 µl of wash buffer was added to each tube prior to data acquisition using a fluorescence activated cell sorter (FACS)Calibur® flow cytometer (Becton Dickinson). Although the fluorescently labelled particles in the BD CBA immunoassay are designed to be excited by the 488-nm laser common to all BD flow cytometers, they can also be excited by the red diode laser on dual-laser BD FACSCalibur instruments. The detection of particle emission on the FL-4 channel simplifies the instrument set-up procedure and reduces the need for fluorescence compensation. Thus, a total of 1,800 events/gate were acquired after proper set-up of a flow cytometer to measure forward (FSC) and side (SSC) light scatters, and dual-colour (FL-4 and FL-2) flow cytometric acquisition, using a dual-laser BD CBA template. Data analysis was performed using BD Bioscience CBA software. The results were expressed as pg/mL.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Shapiro–Wilk tests were used to verify if the variables were normally distributed. Non-parametric data were compared using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunns post-hoc test. Non-normal variables were presented as median and interquartile range (25th–75th percentiles). Correlations were analyzed using the Spearman 2-sided test. Differences were considered significant when $p < 0.005$.

Network Analyses

Cytokine/chemokine/MPs networks were assembled to assess the association between the cytokine, chemokine and MPs each clinical group. The correlations were classified as negative and positive and weak, moderate and strong. The dotted lines represent the negative correlations and the continuous lines the positive ones. The strength of the correlation is represented by the color of the lines - the darker the line, the stronger the correlation.

Spearman's correlation test was performed to assess the association between biomarker levels. The positive and negative correlations were significant when the $p < 0.005$. The correlation index (r) were used to categorize the correlation strength as weak ($r < 0.35$), moderate ($0.36 > r < 0.67$) and strong ($r > 0.68$). The Graphpad Prism 5.00 software (San Diego, USA) was used for correlation analyses, and the Cytoscape (version 3.0.2) used for composing networks of biomolecules interactions.

RESULTS

The mean age of the control group, breast and ovarian cancer patients were 55.8 ± 6.8 ; 54.2 ± 7.3 and 62.3 ± 14.1 , respectively ($p = 0.497$). In the group of patients with breast cancer, 1 (2.6%) had stage I, 17 (44.7%) had stage II, 10 (26.3%) had stage III and 10 (26.3%) had stage IV. Regarding histological grade, 5 patients (13.2%) had grade I, 17 (44.7%) had grade II, and 16 (42.1%) had grade III. Ten of the patients (26.3%) had metastasis, 21 (55.3%) had positive estrogen receptor, 21 (55.3%) had positive progesterone receptor, and 15 (39.5%) had positive Her-2. In the group of patients with EOC, 10 (38.5%) had stage I/II and 16 (61.5%) had stage III/IV ovarian cancer. Among these patients, 8 were type I (30.8%) and 18 were type II (69.2%) tumors (Tabela 1).

As illustrated in Figure 1, the plasmatic concentration of the pro-inflammatory cytokines IL-6 ($p < 0.001$), TNF- α ($p = 0.004$) and IL-12 ($p = 0.0019$) were significantly higher in patients with ovarian cancer compared to women with breast cancer and the control group. Patients with ovarian cancer were also associated with higher levels of IL-10 ($p < 0.001$) and the chemokines CXCL-9 ($p < 0.001$) and CXCL-10 ($p < 0.001$) in comparison to the other groups.

The phenotype of plasma circulating MPs was investigated with specific mAbs for cell markers (i.e. CD41, CD235, CD45, CD3, CD51, CD14 and CD66) that were used to discriminate the cellular sources of annexin V+ MPs. The percentages of annexin V+ MPs stained for each cell marker was compared between samples from breast cancer, epithelial ovarian cancer and control group. The levels of neutrophil derived-MPs was significantly increased in plasma samples from epithelial ovarian cancer patients compared to women with breast cancer and the control group ($p<0.001$). In contrast, endothelial derived MPs were lower in epithelial ovarian patients in comparison to the other groups ($p=0.0491$) (Figure 2).

To evaluate the supposed relationships among cytokines, chemokines and MPs in breast cancer, EOC and control group, using all data obtained in this study, we built biological networks, where the nodes represent the cytokines, chemokines and MPs evaluated, and the lines represent positive or negative correlations and strong, weak or moderate (Figure 3). We observed that there was a balance among cytokines, chemokines and MPs in the breast cancer and control group. In the control group, there were lesser and weaker connections between the biomarkers. The network of the breast cancer group has two isolated groups, the first compound of MPs, with strong and moderate correlations between them, and the other compound of cytokines and chemokines with weak and moderate correlations between them. In EOC patients, the first cluster was characterized by strong and moderate correlations between the MPs. The cytokines and chemokines network presented moderate correlations with the MPs network. The inflammatory/regulatory cytokines and chemokines network in EOC patients presented with a higher complexity in comparison to the other groups. This network included more biomarkers associating between them with negative and positive correlations.

DISCUSSION

The present study investigated plasmatic levels cytokines, chemokines and MPs in women with breast cancer, EOC and without malignancy. The presence of MPs derived from cancer and its inflammatory response cells may serve as a new source of information about the pathophysiology of this disease, as well as act as a possible biomarker for screening,

diagnosis and prognosis of ovarian tumors. It is clear that the MPs are able to directly or indirectly modulate the behavior of the cells around them, especially through the transport of proteins and nucleic acids (22). In addition, the levels of cytokines and chemokines may represent a reflection of the patient's immunity status and serve as biomarkers to predict the prognosis of these women, as well as being potential complementary tools in their post-therapeutic monitoring. Thus, measuring the plasma concentration of cytokines, chemokines and MPs in women with these neoplasias is a noninvasive and indirect way of evaluating tumor activity, associated inflammatory / regulatory systemic response and the role of the microenvironment formed in the pro and antitumor response of the host. In addition, the discovery of new biomarkers may be useful in determining the choice of the most appropriate immunotherapy for each patient group.

The great advantage of cytokines/chemokines and microparticles analysis by flow cytometry is the simultaneous measurement of multiple biomarkers in a single sample (23, 24). The levels of the cytokines/chemokines were significantly increased in plasma samples from EOC patients. The interaction between cytokines, chemokines, MPs, growth factors and their receptors forms a comprehensive network at the tumor site, which is primary responsible for overall tumor progression and spreading or induction of antitumor immune responses and tumor rejection (25, 26).

Higher levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and IL-12), regulatory cytokines (IL-10), and chemokines (CXCL-9 and CXCL-10) were seen in patients with EOC. These results suggest that there is a pro-inflammatory/regulatory environment for ovarian cancer development. Several studies have shown that ovarian malignancies express high levels of some cytokines such as TNF and IL-6, indicating the potential of these molecules as inducers / regulators of inflammation in these tumors (27). The EOC is associated with a predominantly humoral immune response and an immunosuppressive pattern, with IL-6, IL-10 and IFN- γ involved in the prognosis of patients with EOC. There is also an association between the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the IL-10 immunosuppressive oxytocin to the EOC and his poor prognosis. High levels of IFN- γ were associated with increased overall survival and high levels of IL-6 and IL-10 at lower overall survival. Thus, controlling the mechanisms that lead to increased levels of IL-10 and IL-6 and controlling IFN- γ levels in the tumor microenvironment may help in the development of target therapies for ovarian cancer (10).

Interactions between cytokines, their influence on immune system cells and the expression of surface antigens, as well as the multifactorial regulation of their secretion show that IL-10 and TNF- α are functionally related and their concentrations can be correlated with other. After the primary activation of proinflammatory processes, characterized by the presence of TNF- α , the inflammatory response is suppressed through the activation of immunosuppressive mechanisms and the release of IL-10. Evidence suggests a negative correlation between TNF- α and IL-10, where TNF- α production is inhibited proportionally to the increase in IL-10 concentration. TNF- α interacts with cancer cells through its specific receptor, which results in activation of the arachidonic acid cascade, generation of reactive oxygen species within the cell and cell death (28).

The expression of IL-6 is induced by IL-1, TNF and platelet activation factor. It exerts several antitumor effects, including the induction of apoptosis and necrosis, activation of cytolytic cells and regulation of the expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (29). IL-6 has been proposed to be a central cytokine that promotes the progression of ovarian cancer, although the exact role during disease development is not well established. IL-6 antagonist signaling has been accepted to have therapeutic activity by inhibiting the cytokine network in ovarian cancer (30).

IL-12 has potent effects on innate and adaptive immunity. It can induce IFN- γ secretion by T cells and NK cells and it also enhances the antitumor activity of NK cells. The activities of IL-12 are antagonized primarily by IL-10 (29, 31, 32). The results of preclinical studies suggest several potential strategies for the use of IL-12 in cancer therapy (33). IL-10 is produced by activated monocytes, which according to its concentration in the local microenvironment may have immunosuppressive or immunostimulatory action (29). IL-10 probably interferes with the systemic and local antitumor response and promotes the progression of malignant ovarian neoplasms (28). All these interactions between the different cytokines show an apparent dichotomization in the inflammatory profile of breast and ovary cancers, with stimulatory action exerted by most cytokines and immunosuppressive action by others, mainly by IL-10.

The CXCL10 is secreted by various types of cells, including endothelial cells, stimulated by IFN- γ , which mediated by the IL-12 cytokine family. CXCL-10 appears to contribute to the pathogenesis of many autoimmune or systemic diseases and the

determination of the high level of CXCL10 in peripheral fluids is a marker of the patient's immune response (34).

A number of studies suggest that factors related to inflammation of the ovarian surface epithelium, such as ovulation, endometriosis, and pelvic inflammatory diseases are associated with an increased risk of EOC. The course of sequential action of ovulation causes oxidative stress by increasing the concentration of pro-inflammatory mediators, such as cytokines, interleukins, growth factors, prostaglandins and eicosanoids. Inflammatory mediators and various cytokines produced by activated innate immune cells, such as tumor necrosis factor (TNF) γ , interleukin (IL) -1 and IL-6 have been shown to promote the genesis, growth and progression of EOC. Most studies on the role of inflammation focus on IL-6 signaling, which seems to play the leading role. IL-6 is one of the major immunoregulatory cytokines present in the EOC microenvironment (35).

Specifically, the breast cancer research has focused on the inflammatory chemokines CCL2 and CCL5. These chemokines are well recognized because of their activities in the immune context, where they induce leukocyte-directed motility. Acting mainly on inflammatory reactions, these two chemokines stimulate the migration of mainly monocytes and T cells to damaged or infected sites (12). In contrast, some cytokines promote the generation and / or efficacy of antitumor agents, such as dendritic cells and lymphokine activated killer, causing tumor growth inhibition or regression. In addition to its effects on the immune system, cytokines also influence aromatase activity and estrogen synthesis in the vicinity of the tumor promoting growth and aggressiveness (29).

It has been known that tumor microenvironment consists of a variable combination of tumor cells, stromal fibroblasts, endothelial cells and infiltrating leukocytes, such as neutrophils, macrophages, lymphocytes and other inflammatory cells, and they play a fundamental role in tumor modulation and progression (26). In the present study we proposed to study the MPs plasmatic levels, which may represent an ideal biomarker because they can be easily isolated from blood, and they have particular features (mainly regarding microRNA profiles) that strongly correlate with ovarian cancer stage and may be effective for early diagnosis (36). They are involved in several hallmarks of cancer such as drug resistance, thrombosis, immune evasion, angiogenesis, tumor invasion and metastasis (37).

The levels of neutrophil derived-MPs was significantly increased and the endothelial derived MPs were lower in plasma samples from EOC patients. This is an interesting result,

and could be correlated with the ability of the tumor to express biomarkers. Some authors demonstrated that activated polymorphonuclear neutrophils release MPs at the time of degranulation. Neutrophil derived-MPs have recently been shown to inhibit the inflammatory properties of human monocyte-derived macrophages *in vitro*, which in the local context may participate in the control of immune responses. These neutrophil derived-MPs have the particularity to be involved very early in inflammation, which might be crucial for determining later aspects of the cascade responsible for acquired immunity, and may be responsible for controlling the immune response as well (38, 39).

In this study, the hierarchical network was used to simulate the microenvironment of the studied groups. In women with ovarian malignancy, a greater number of strong interactions between inflammatory and immune factors were observed, as well as a greater complexity of all interactions. This may reflect a greater systemic inflammatory response in ovarian cancer, involving a greater number of biomarkers, with different interactions between them. This can be explained by the specific location of the ovary epithelial cells in the peritoneal cavity, and they are clearly exposed to various pro-inflammatory agents (35).

Oppositely, in the breast cancer group, cytokines and the chemokine network were less complex than the control group, and the EOC group, with fewer biomarkers involved, had a greater number of weak interactions between them and with total separation between the group of the microparticles and the group of cytokines and chemokines, suggesting a lower systemic anti-inflammatory response associated with this tumor. This can be explained by the fact that breast cancer is considered to be poorly immunogenic and poorly recognized by the immune system, despite the presence of infiltrating lymphocytes in the tumor. It is believed that this lack of effective immune response is due to the action of "inhibitory" cytokines in the tumor's microenvironment, leading to a compromised immune system in these patients, although in this study an increase of IL-10, the major cytokine of immunosuppressive action, has not been evidenced in breast cancer. (29, 40).

Thus, it can be said that a different pattern of the networks of inflammatory factors and MPs of women with EOC and breast cancer was found. The present study demonstrated that the EOC appears to have a greater systemic inflammatory response and a greater expression of proinflammatory / regulatory cytokines and chemokines compared to breast cancer, reflecting different signatures of these two diseases, as well as discrepancies between carcinogenesis of both. According to these results, some studies have shown that in the EOC

there is a larger pro-inflammatory microenvironment and a more complex communication pathway, with exchange of signaling factors that together can support tumor growth and progression (29, 40).

This study has some limitations. The statistical analysis was based on multiple comparisons, aiming to find possible associations between cytokines, chemokines and MPs; however, it should be borne in mind that these significant findings were hypothesis-makers and therefore represent a realistic interpretation of the facts. In addition, the limited number of EOC patients in the study is explained by the low prevalence of the disease. Additional approaches should also be explored to ensure the ability to isolate and quantify MPs from blood and other biological fluids from ovarian cancer patients.

The current study is a promising and original research that, through knowledge of the inflammatory response profile of breast and ovarian cancer, showed different signatures of each disease, signaling to possible biomarkers for screening, diagnosis, prognosis and post-therapeutic follow-up. And, in addition, increasing the possibility of patient selection for specific types of target therapies according to the inflammatory response profile of the disease and the presence of a certain altered biomarker. Thus, full understanding of cancer immunobiology will stimulate the development of more effective immunotherapeutic approaches against these tumors.

FIGURE AND TABLES LEGENDS

Figure 1 – Comparison of cytokines pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ), regulatory cytokines (IL-2, IL-10, IL-17a) and chemokines (CCL-2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) in control group, breast and ovarian cancer patients.

Note: BC: Breast cancer; EOC: Epithelial ovarian cancer. Data are expressed as median and interquartile ranges. Differences between groups were evaluated by Kruskal-Wallis test.

Figure 2 – Comparison of circulating microparticles (MPs) between control group, breast and ovarian cancer patients according to their specific cellular origin.

Note: BC: Breast cancer; EOC: Epithelial ovarian cancer. Data are expressed as median and interquartile ranges. Differences between groups were evaluated by Kruskal-Wallis test.

Figure 3 – Biomarkers networks in control group (A), breast (B) and epithelial ovarian cancer (C) patients according to their specific cellular origin.

Note: MPs nodes were assembled as well as the biomarkers correlation indexes amongst groups. The strength of the interactions is represented by different line style according to the following ranges, negative ($r < 0$ – dotted line); positive ($r > 0$ – continuous line), weak ($0 > r < 0.36$ – clearer line), moderate ($0.36 > r < 0.67$) and strong ($r > 0.68$ – darker line).

Tabela 1 – Characteristics of the groups studied (control group, patients with breast cancer and patients with ovarian cancer)

FIGURES

Figure 1

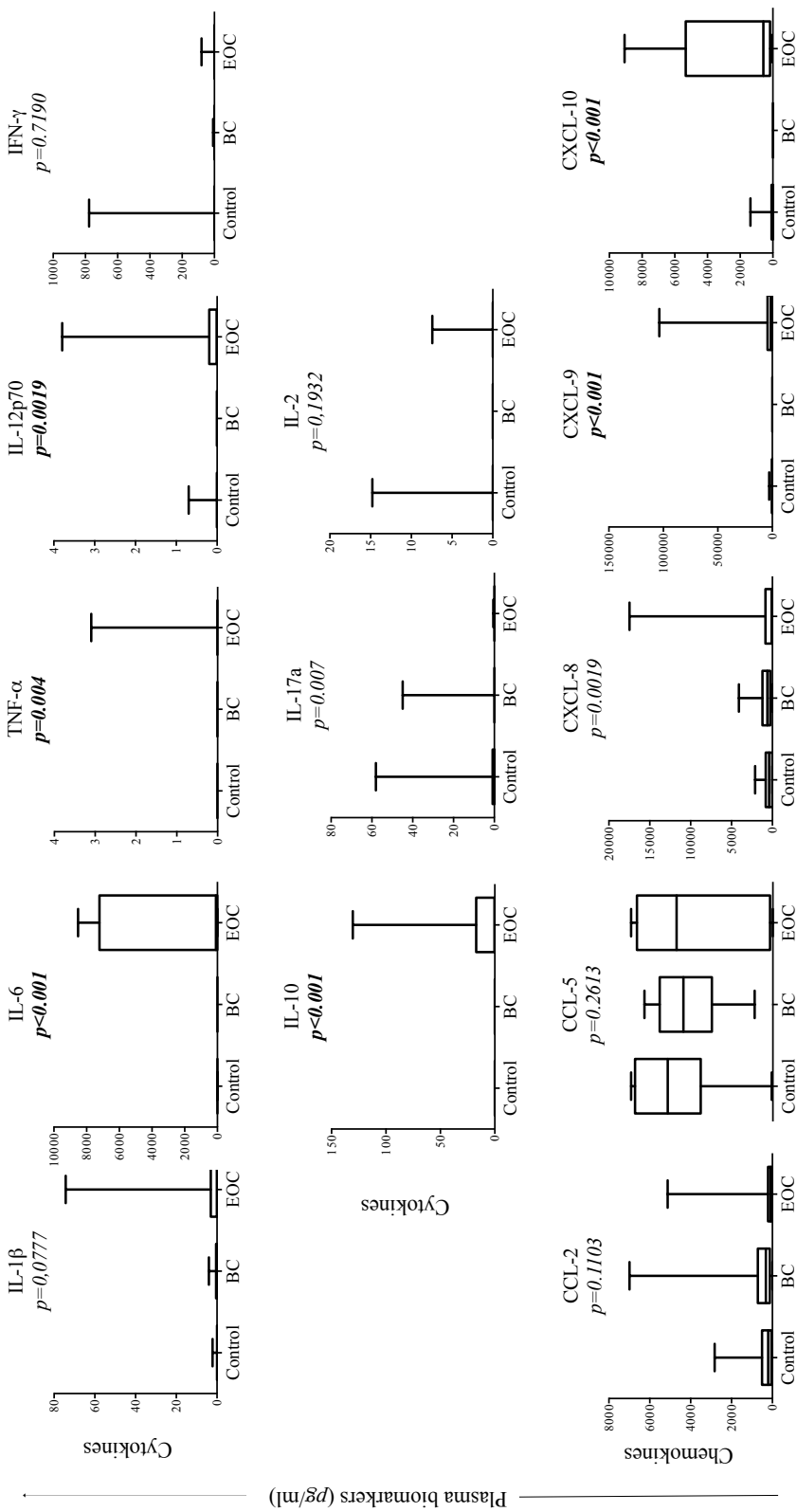


Figure 2

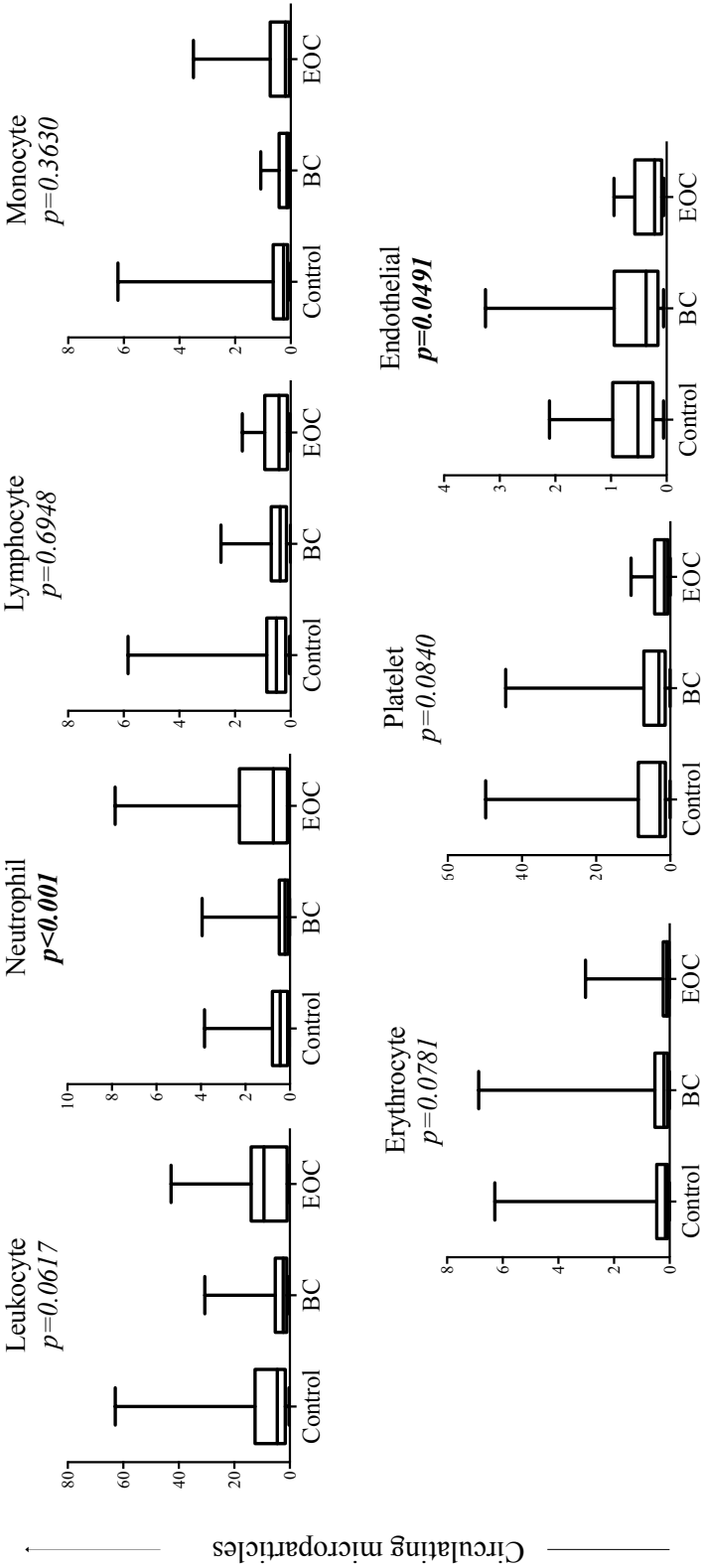
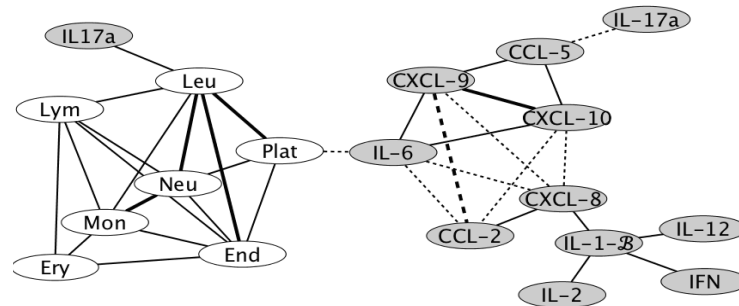
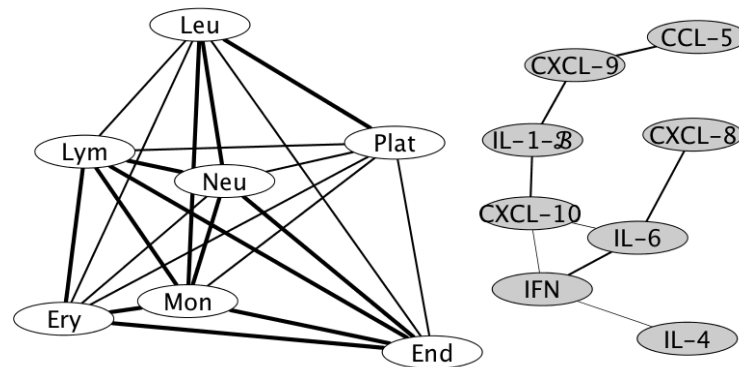


Figure 3

A



B



C

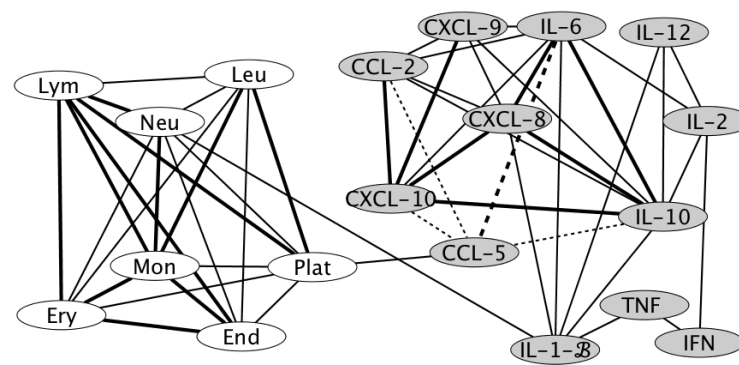


Tabela 1

	Control group	Breast cancer patients	Ovarian cancer patients
Mean age	55.8 ± 6.8	54.2±7.3	62.3 ± 14.1
Staging of the disease	–	stage I: 1 (2.6%) stage II: 17 (44.7%) stage III: 10 (26.3%) stage IV: 10 (26.3%)	stage I/II: 10 (38.5%) stage III/IV: 16 (61.5%)
Histological grade	–	grade I: 5 (13.2%) grade II: 17 (44.7%) grade III: 16 (42.1%)	type I: 8 (30.8%) type II: 18 (69.2%)

REFERENCES

- 1 - Institute, N.C. *SEER Stat Fact Sheets: Ovarian Cancer*. 2017 [cited 2017 07/12/2017]; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>
- 2 - Reis FM, S.F.A., Triginelli SA, Camargos AF, *Biochemical markers of ovarian cancer: diagnostic and prognostic value*. Italian Journal of Gynaecology & Obstetrics, 2004. **16**(3): p. 5.
- 3 - Basu, S., et al., *Eicosanoids and adipokines in breast cancer: from molecular mechanisms to clinical considerations*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(3): p. 323-60.
- 4 - Wang, L., *Early Diagnosis of Breast Cancer*. Sensors (Basel), 2017. **17**(7).
- 5 - Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
- 6 - Kurman, R.J. and M. Shih le, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. **42**(7): p. 918-31.
- 7 - Nash, M.A., et al., *The role of cytokines in both the normal and malignant ovary*. Endocr Relat Cancer, 1999. **6**(1): p. 93-107.
- 8 - Leonard, W.J. and J.X. Lin, *Cytokine receptor signaling pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 877-88.
- 9 - Maccio, A. and C. Madeddu, *Inflammation and ovarian cancer*. Cytokine, 2012. **58**(2): p. 133-47.
- 10 - Candido, E.B., et al., *Immune response evaluation through determination of type 1, type 2, and type 17 patterns in patients with epithelial ovarian cancer*. Reprod Sci, 2013. **20**(7): p. 828-37.
- 11 - Shannon, P., et al., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res, 2003. **13**(11): p. 2498-504.
- 12 - Soria, G. and A. Ben-Baruch, *The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 271-85.
- 13 - Van Aalderen, M.C., et al., *Procoagulant myeloblast-derived microparticles in AML patients: changes in numbers and thrombin generation potential during chemotherapy*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(1): p. 223-6.
- 14 - Gong, J., et al., *Microparticles in cancer: A review of recent developments and the potential for clinical application*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 35-40.
- 15 - 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.
- 16 - Tiezzi, D.G., et al., *HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 36.
- 17 - Ladoire, S., et al., *In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival*. J Pathol, 2011. **224**(3): p. 389-400.

-
- 18 - Combes, V., et al., *Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma*. JAMA, 2004. **291**(21): p. 2542-4.
- 19 - Paik, E.S., et al., *Survival analysis of revised 2013 FIGO staging classification of epithelial ovarian cancer and comparison with previous FIGO staging classification*. Obstet Gynecol Sci, 2015. **58**(2): p. 124-34.
- 20 - Tarnok, A., et al., *Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum*. Clin Chem, 2003. **49**(6 Pt 1): p. 1000-2.
- 21 - Peruhype-Magalhaes, V., et al., *Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to Leishmania chagasi infection*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(1): p. 124-32.
- 22 - Lyon, D.E., et al., *Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy*. Nurs Res, 2008. **57**(1): p. 51-8.
- 23 - Leonard, W.J. and J.X. Lin, *Cytokine receptor signaling pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 877-88.
- 24 - Barteneva, N.S., et al., *Circulating microparticles: square the circle*. BMC Cell Biol, 2013. **14**: p. 23.
- 25 - Wu, Z.H., et al., *Membrane microparticles and diseases*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(18): p. 2420-7.
- 26 - 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.
- 27 - Shield, K., et al., *Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis*. J Carcinog, 2007. **6**: p. 11.
- 28 - Sipak-Szmigiel, O., et al., *Serum and peritoneal fluid concentrations of soluble human leukocyte antigen, tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in patients with selected ovarian pathologies*. J Ovarian Res, 2017. **10**(1): p. 25.
- 29 - Rao, V.S., et al., *Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review)*. Oncol Rep, 2006. **15**(1): p. 179-85.
- 30 - Chen, Q., et al., *High mRNA expression level of IL-6R was associated with better prognosis for patients with ovarian cancer: a pooled meta-analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8769.
- 31 - Chiang, C.L., et al., *Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 198.
- 32 - Curiel, T.J., et al., *Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5535-8.
- 33 - Tada, H., et al., *Reprogrammed chondrocytes engineered to produce IL-12 provide novel ex vivo immune-gene therapy for cancer*. Immunotherapy, 2017. **9**(3): p. 239-248.
- 34 - Antonelli, A., et al., *Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(3): p. 272-80.
-

-
- 35 - Kisielewski, R., et al., Inflammation and ovarian cancer--current views. *Ginekol Pol*, 2013. 84(4): p. 293-7.
- 36 - Giusti, I., S. D'Ascenzo, and V. Dolo, Microvesicles as potential ovarian cancer biomarkers. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 703048.
- 37 - Voloshin, T., E. Fremder, and Y. Shaked, Small but mighty: microparticles as mediators of tumor progression. *Cancer Microenviron*, 2014. 7(1-2): p. 11-21.
- 38 - Eken, C., et al., Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2008. 180(2): p. 817-24.
- 39 - Falanga, A., C.J. Tartari, and M. Marchetti, Microparticles in tumor progression. *Thromb Res*, 2012. 129 Suppl 1: p. S132-6.
- 40 - Allan, C.P., et al., The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy. *Cytotherapy*, 2004. 6(2): p. 154-63.
-

7. Conclusões

Níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-12), citocinas reguladoras (IL-10) e quimiocinas (CXCL-9 e CXCL-10) foram observados em pacientes com CEO em comparação com mulheres com câncer de mama e do grupo controle, sugerindo um maior ambiente pró-inflamatório/regulatório para o desenvolvimento de câncer de ovário.

Os níveis de MPs derivados de neutrófilos foram maiores e as MPs derivadas de células endoteliais foram menores em amostras de plasma de pacientes com CEO em comparação com mulheres com câncer de mama e do grupo controle.

Através de redes para simular o microambiente dos grupos estudados e avaliar as relações entre citocinas, quimiocinas e MP foram observadas fortes interações entre fatores inflamatórios e imunes em mulheres com malignidade ovariana, o que mostra discrepâncias entre a carcinogênese no câncer de ovário e de mama e sugere um padrão inflamatório sistêmico diferente em pacientes com CEO e câncer de mama. Esse estudo demonstrou que CEO parece ter maior resposta inflamatória sistêmica. Opostamente, no câncer de mama, a rede de citocinas e quimiocinas foi menos complexa, sugerindo uma menor resposta antiinflamatória sistêmica associada a este tumor.

8. Considerações Finais

Este estudo é uma pesquisa promissora e original que, através do conhecimento do perfil de resposta inflamatória do câncer de mama e ovário, além de mostrar assinaturas diferentes de cada doença, sinaliza para potenciais biomarcadores para rastreio, diagnóstico, prognóstico e seguimento pós terapêutico. Além disso, levanta a possibilidade de seleção de pacientes para tipo específicos de terapia alvo de acordo com o perfil de resposta inflamatória da doença e da presença de determinado biomarcador alterado.

Assim, a plena compreensão da imunobiologia do câncer irá estimular o desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas mais eficazes contra esses tumores.

9. Anexos

Anexo 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)****Resolução 466/2012**

Convido, a senhora para participar do projeto de pesquisa intitulado “Comparação dos níveis séricos de citocinas, quimiocinas e micropartículas em mulheres com câncer de mama e de ovário”, que será desenvolvido por mim Aline Evangelista Santiago, Ginecologista e Mestranda do Programa de Pós-Graduação de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com orientação do profissional médico e professor Agnaldo Lopes da Silva.

Estou estudando os cânceres de ovário e de mama. Você está sendo convidada porque apresenta o câncer de ovário, mama ou porque não apresenta qualquer tipo de câncer. A sua participação neste estudo consiste em doar 10ml do seu sangue, que será coletado antes da cirurgia e onde serão realizadas as dosagens laboratoriais. As amostras serão descartadas após interpretação dos resultados.

Os riscos associados com a coleta de sangue serão a picada da agulha e uma mancha roxa que desaparecerá bem rapidamente. Além disso você pode sentir dor ou algum desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local da punção podem ocorrer. Cuidados vão ser tomados para diminuir esses riscos e caso ocorram a senhora terá assistência integral garantida por parte da equipe de pesquisa.

Solicito também seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como idade, exames e tratamentos anteriores e doenças referentes a consultas feitas anteriormente pela senhora.

Além disso a senhora responderá um questionário que levará uns 15 minutos de duração.

Este estudo pode não trazer benefícios diretos para a senhora. Seu benefício em participar será a ajuda para estudar os cânceres de ovário e de mama, podendo resultar no desenvolvimento de novos tratamentos para futuros pacientes com essas doenças.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento. Importante ressaltar também que a senhora não terá nenhuma despesa em participar do estudo, pois os exames que serão realizados já fazem parte da rotina dos ambulatórios de ginecologia do Hospital Vera Cruz.

Este termo de consentimento livre e esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue à senhora devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o comitê de ética em pesquisa da UNESP através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Vera Cruz através dos telefones 3290-1000 ou 3290-1100 ou no endereço Av. Barbacena, 653, Barro Preto - Belo Horizonte – Minas Gerais. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, concordo em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Belo Horizonte, ____/____/____

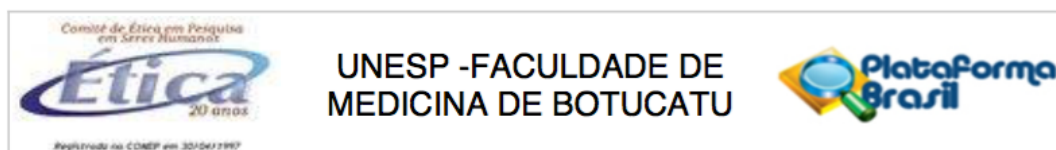
pesquisador

Nome Aline Evangelista Santiago
Endereço: Rua Teófilo Otoni, Centro –
Sete Lagoas – Minas Gerais
Telefone: (31) 99795-8003
Email: evalineva@hotmail.com

participante da pesquisa

Nome Agnaldo Lopes Da Silva Filho
Endereço: Avenida Professor Alfredo
Balena 110/40andar - Santa Efigênia -
Belo Horizonte - Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-9764
Email: agnaldo.ufmg@gmail.com

Anexo 2

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E MICROPARTÍCULAS EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA E DE OVÁRIO

Pesquisador: Aline Evangelista Santiago

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70300917.6.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.207.189

Apresentação do Projeto:

Cânceres de ovário e mama continuam a acometer grande parte da população feminina, causando morbidade e mortalidade relevantes. A melhor compreensão da carcinogênese pode permitir intervenções preventivas e terapêuticas precoces. Nesse contexto, a pesquisadora pretende estudar biomarcadores dessas neoplasias. Entre estes incluem-se fatores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e micropartículas produzidas por várias células do organismo (ex.: neutrófilos, plaquetas, células endoteliais, etc.). Serão recrutadas 90 mulheres para o estudo, assim distribuídas: 30 com câncer de mama, 30 com câncer de ovário e 30 controles saudáveis. Todos os sujeitos serão recrutados no Hospital Vera Cruz (Belo Horizonte) e testes realizados no laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) de Minas Gerais. O procedimento de pesquisa será a coleta de 10 ml de sangue (suficientes para os testes laboratoriais), aplicação de um questionário e revisão de prontuários médicos. Comparações entre os resultados para os três grupos serão realizadas. TRATA-SE DE UM PROJETO DE MESTRADO VINCULADO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA, OBSTETRÍCIA E MASTOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU, UNESP.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar níveis séricos de citocinas, quimiocinas e micropartículas entre mulheres com câncer de

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

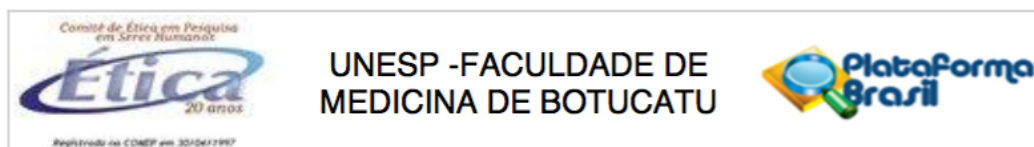
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.207.189

mama, câncer de ovário e saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, relacionados a punção venosa e ao sigilo de dados de questionário e prontuário. Os benefícios são indiretos, pelo maior conhecimento de biomarcadores de cânceres de mama e ovário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo pertinente e factível nas condições propostas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam-se três versões do TCLE (uma para cada grupo), todas com linguagem acessível e texto claro.

Há declaração de participação do Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte (onde serão realizados os recrutamentos) e de realização dos testes laboratoriais pela FioCruz.

Há ainda a anuência do EAP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 07/08/2017, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado o Relatório Final de Atividades, o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 07/08/2017

– DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_926294.pdf	26/06/2017 11:03:15		Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

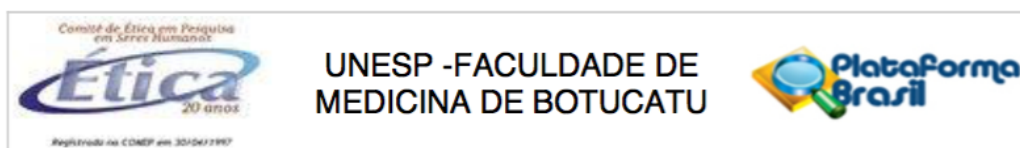
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.207.189

Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	26/06/2017 11:02:43	Aline Evangelista Santiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcaovario.docx	10/06/2017 11:44:56	Aline Evangelista Santiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcamama.docx	10/06/2017 11:44:19	Aline Evangelista Santiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEgrupocontrole.docx	10/06/2017 11:43:50	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MEUprojetoUnespVera.docx	22/05/2017 09:12:29	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Outros	vinculo.pdf	22/05/2017 09:09:20	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciaeap.pdf	22/05/2017 09:07:52	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciafiocruz.pdf	22/05/2017 09:07:03	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CoParticipacaoveracruz.pdf	22/05/2017 09:06:40	Aline Evangelista Santiago	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 08 de Agosto de 2017

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Anexo 3

HOSPITAL VERA CRUZ - HVC/
MG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E MICROPARTÍCULAS EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA E DE OVÁRIO

Pesquisador: Aline Evangelista Santiago

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70300917.6.3001.5135

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.264.267

Apresentação do Projeto:

Cânceres de ovário e mama continuam a acometer grande parte da população feminina, causando morbidade e mortalidade relevantes. A melhor compreensão da carcinogênese pode permitir intervenções preventivas e terapêuticas precoces. Nesse contexto, a pesquisadora pretende estudar biomarcadores dessas neoplasias. Entre estes incluem-se fatores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e micropartículas produzidas por várias células do organismo (ex.: neutrófilos, plaquetas, células endoteliais, etc.). Serão recrutadas 90 mulheres para o estudo, assim distribuídas: 30 com câncer de mama, 30 com câncer de ovário e 30 controles saudáveis. Todos os sujeitos serão recrutados no Hospital Vera Cruz (Belo Horizonte) e testes realizados no laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) de Minas Gerais. O procedimento de pesquisa será a coleta de 10 ml de sangue (suficientes para os testes laboratoriais), aplicação de um questionário e revisão de prontuários médicos. Comparações entre os resultados para os três grupos serão realizadas.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar níveis séricos de citocinas, quimiocinas e micropartículas entre mulheres com câncer de mama, câncer de ovário e saudáveis

Endereço: Rua Timbiras, 3156, 6º andar sala 603

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.140-062

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3290-1177

E-mail: cep@hvc.com.br

HOSPITAL VERA CRUZ - HVC/ MG



Continuação do Parecer: 2.264.267

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, relacionados a punção venosa e ao sigilo de dados de questionário e prontuário. Os benefícios são indiretos, pelo maior conhecimento de biomarcadores de cânceres de mama e ovário

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentarios

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos dentro das normas preconizadas

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendencias

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_926294.pdf	26/06/2017 11:03:15		Aceito
Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	26/06/2017 11:02:43	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_926294.pdf	10/06/2017 11:50:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcaovario.docx	10/06/2017 11:44:56	Aline Evangelista Santiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcamama.docx	10/06/2017 11:44:19	Aline Evangelista Santiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEgrupocontrole.docx	10/06/2017 11:43:50	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_926294.pdf	22/05/2017 09:13:19		Aceito
Projeto Detalhado	MEUprojetoUnespVera.docx	22/05/2017	Aline Evangelista	Aceito

Endereço: Rua Timbiras, 3156, 6º andar sala 603

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.140-062

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3290-1177

E-mail: cep@hvc.com.br

**HOSPITAL VERA CRUZ - HVC/
MG**

Continuação do Parecer: 2.264.267

/ Brochura Investigador	MEUprojetoUnespVera.docx	09:12:29	Santiago	Aceito
Outros	vinculo.pdf	22/05/2017 09:09:20	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciaeap.pdf	22/05/2017 09:07:52	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciafiocruz.pdf	22/05/2017 09:07:03	Aline Evangelista Santiago	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CoParticipacaooveracruz.pdf	22/05/2017 09:06:40	Aline Evangelista Santiago	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 07 de Setembro de 2017

Assinado por:

ANDRE LUIS BERNADELI FERREIRA
(Coordenador)**Endereço:** Rua Timbiras, 3156, 6º andar sala 603**Bairro:** Barro Preto**CEP:** 30.140-062**UF:** MG**Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3290-1177**E-mail:** cep@hvc.com.br