

JOÃO OSCAR DE ALMEIDA FALCÃO JÚNIOR

**Análise comparativa da expressão de
quimiocinas, citocinas e micropartículas em
pacientes com câncer de ovário e
endometriomas.**

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

BOTUCATU / SÃO PAULO

2014

JOÃO OSCAR DE ALMEIDA FALCÃO JÚNIOR

**Análise comparativa da expressão de
quimiocinas, citocinas e micropartículas em
pacientes com câncer de ovário e
endometriomas.**

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

ORIENTADOR: PROF. DR PAULO TRAIMAN

CO-ORIENTADORES: PROFA. DRA. ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO.

BOTUCATU / SÃO PAULO

2014

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

Falcão Júnior, João Oscar de Almeida.

Análise comparativa da expressão de quimiocinas, citocinas e micropartículas em pacientes com câncer de ovário e endometriomas / João Oscar de Almeida
Falcão Júnior. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paulo Traiman

Coorientador: Andréa Teixeira de Carvalho

Capes: 40101150

1. Ovário - Câncer - Tratamento. 2. Câncer - Cirurgia. 3. Endometriose. 4. Resposta imune. 5. Citocinas. 6. Inflamação. 7. Quimiocinas.

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



Dedicatória

DEDICO ESTA TESE...

A minha querida esposa Débora, que sempre, com muito amor, me deu suporte para lutar pelos meus sonhos.

Aos meus filhos Gustavo, Gabriela e Augusto a quem pretendo ser exemplo que inspire a persistência, dedicação, fé e amor por tudo aquilo que fazemos.

Sou profundamente grato ao Professor Paulo Traiman e ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, que criaram as pontes de ligação que permitiram a edificação da parceria que viabilizou meu encontro com esta instituição, e a realização deste importante projeto de minha vida.

Mais do que isto, agradeço o carinho e o respeito que, ambos, sempre dedicaram a mim.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, João Oscar, exemplo de ética, retidão de caráter e amor à família.

Ao Renato e à Vera que me fizeram filho e sempre representaram e representam amor e acolhida na minha vida.

A minha sogra, Teresa, companheira da luta diária e apoio constante para toda a nossa casa.

Aos meus irmãos Vitor, Isadora, Stefano, Larissa e, ao também irmão, Tenison que, com sua torcida e incentivo incondicional, fazem todos os obstáculos parecerem mais facilmente transponíveis.

À Dra. Andréa Teixeira de Carvalho que desde o primeiro momento acreditou, apoio e orientou nosso estudo, sendo o verdadeiro esteio de todo o projeto.

À Sálua Oliveira Calil de Paula, companheira de pesquisa e de trabalho, apoio de todos os momentos desta jornada, amiga para a vida.

A toda equipe do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou que abraçaram nossa ideia e com grande dedicação a transformaram em realidade.

Aos alunos de iniciação científica, Bruno Marteleto e Jordâna Rodrigues Barbosa Fradico, com quem foi sempre possível contar a toda e qualquer hora.

Ao Dr. José Salvador Silva, ao Dr. Henrique Moraes Salvador Silva, à Dra Márcia Salvador Geo e a todos do Hospital Mater Dei que me propiciam a oportunidade de desenvolver meu trabalho em um ambiente estimulante, desafiador e sempre receptivo e acolhedor de nossas aspirações profissionais.

Aos anestesistas e toda a equipe do bloco cirúrgico do Hospital Mater Dei, especialmente, Renato Hebert e Marden, grandes companheiros em nossa rotina de trabalho e também neste estudo.

A equipe de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Mater Dei, da qual tenho orgulho de fazer parte, agradeço a todos pelas experiências compartilhadas ao longo de todos estes anos.

Aos Drs. Walter Antônio Prata Pace e Francisco Pereira de Assis pela oportunidade de solidificar uma valorosa amizade.

À Coordenação do curso de pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, aos Professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, e a todos os demais colaboradores da desta instituição, a acolhida, dedicação e generosidade que nos dedicam, nos inspiram e nunca serão esquecidos.

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

À minha mãe, in memoriam.

A Deus, pela minha vida, por tudo o que sou e tudo o que serei.

Financiamento.

Este estudo foi financiado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Os autores agradecem também o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde -PDTIS-FIOCRUZ para o uso de suas instalações. OAMF e ATC CNPq para bolsas (PQ).



Επίγραφε

Se você deseja um ano de prosperidade, cultive grãos.
Se você deseja 10 anos de prosperidade, cultive árvores.
Mas se você quer 100 anos de prosperidade, cultive gente.”

Ditado Chinês.

“Não ande apenas pelo caminho traçado, pois ele
conduz somente até onde os outros já foram.”

Alexander Graham Bell



Índice

ÍNDICE:

Siglas	16
Glossário	19
Resumo	21
1. Introdução.....	24
2. Objetivos	30
2.1. Objetivo geral	31
Objetivos específicos	31
3. Casuística e Métodos.....	32
Casuística	33
Métodos	34
Abordagem cirúrgica e coleta material biológico.....	34
Avaliação da expressão gênica relativa por RT-qPCR	36
Avaliação das citocinas e quimiocinas	42
Avaliação das micropartículas	45
Análise estatística	48
4. Referências	50
5. Artigo I.....	54
6. Artigo II	73
7. Considerações finais	93

8. Anexos	96
I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Mater Dei (CEP)	97
II. Consentimento livre e esclarecido.....	98
III. Estadiamento do câncer epitelial de ovário (FIGO).....	100
IV. Classificação da endometriose (ASRM).....	101
9. Summary	102



Siglas

SIGLAS:

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CBA	<i>Cytometric bead array</i> – ensaio com microesferas fluorescentes empregando citometria de fluxo
CC	Família de quimiocinas com duas cisteínas equivalentes próximas à porção amino-terminal.
CCR	Receptor de quimiocina com duas cisteínas equivalentes próximas à porção amino-terminal.
CEO	Câncer epitelial do ovário
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CXC	Família de quimiocinas com duas cisteínas equivalentes separadas por um aminoácido qualquer.
CXCR	Receptor de quimiocina com duas cisteínas equivalentes separadas por um aminoácido qualquer.
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FL	Fluorescência
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HE	Hematoxilina e eosina
IL	Interleucina.
kda	Kilodalton
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanómetro
n	Número total da amostra
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	P valor / P value – nível descritivo
pg/ml	Picograma por mililitro
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and</i>

	<i>Secreted</i>
τ	Coeficiente de Kendall tau
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TGF	Tumor Growth Factor
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
U/ml	Unidades por mililitro
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular



Glossário

Células T	Linfócitos T. Constituem um subgrupo de linfócitos definidos pelo seu desenvolvimento no timo e por receptores heterodiméricos associados às proteínas do complexo CD3.
Citocinas	São proteínas sintetizadas por células que afetam o comportamento de outras células. Atuam em receptores específicos das células-alvo.
Interleucina.	Termo usado para citocinas produzidas por leucócitos.
Micropartículas	São pequenas vesículas derivadas da membrana celular.
Proteína G	Proteínas que ligam GTP, convertendo-a a GDP no processo de transdução do sinal celular.
Quimiocinas	São pequenas proteínas quimio-atraentes, envolvidas na migração e na ativação de células, especialmente fagocitárias e linfocitárias.
Quimiocinese	Aumento da atividade de uma substância, pela ação de um catalisador químico.
Quimiotaxia	Processo de locomoção orientada ao longo de um gradiente químico.



Resuma

RESUMO:

Introdução: O câncer epitelial de ovário (CEO) e endometriose apresentam alguns aspectos semelhantes, como infiltração tecidual e capacidade de produzir lesões em órgão adjacentes e a distância, no entanto, diferem de forma marcante em sua evolução. A análise das semelhanças e diferenças do sistema imune e resposta inflamatória relacionados a estas patologias podem permitir um melhor entendimento de seus mecanismos fisiopatológicos e consequentemente contribuir no aprimoramento do rastreamento, diagnóstico e estratégias terapêuticas. O objetivo deste estudo é avaliar e comparar a expressão gênica tecidual, citocinas, quimiocinas e micropartículas no plasma, líquido ascítico e lavado peritoneal de pacientes com CEO e endometrioma.

Métodos: Foram estudadas 60 pacientes, divididas em 3 grupos: Grupo 1 (CEO): 26 pacientes; Grupo 2 (endometriomas): 18 pacientes; Grupo 3 (controle): 16 pacientes. Todas as pacientes tiveram coletadas amostras de sangue, líquido ascítico ou lavado peritoneal e amostra tecidual das lesões. O material foi estocado para posterior análise. Citocinas e quimiocinas foram dosadas utilizando-se CBA, as amostras teciduais foram avaliadas com técnica de RT-qPCR e as micropartículas com técnica de imunofluorescência modificada para esta análise. Utilizou-se os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis quando apropriados. Para a identificação de associações entre dosagens de líquido ascítico e soro foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. **Resultados:** A idade média das pacientes nos grupos CEO, endometrioma e controle foram respectivamente 62, 37 e 40,2 anos. Os pacientes foram estadiados segundo os critérios da FIGO para o câncer de ovário, 10 pacientes nos estádios I e II, e 16 no estágio III/IV no grupo de CEO. O estadiamento dos pacientes com endometriomas foram realizados conforme os critérios da ASRM identificando-se 15 pacientes no estágio III e 3 no estágio IV. As dosagens séricas de quimiocinas e citocinas demonstraram uma concentração de IL6 ($p = 0,0001$), IL10 ($p = 0,0109$), CXCL8 ($p = 0,0463$) e CCL2 ($p = 0,026$) maior no CEO em relação aos

controles. Os marcadores IL6 ($p = 0,0006$), CXCL99 ($p = 0,0009$), CXCL10 ($p = 0,0011$) apresentaram maior dosagem no grupo de CEO em relação ao Grupo endometrioma. Em contraste a estes, na análise de líquido ascítico e lavado peritoneal, IL8 ($p = 0,0061$), CCL2 ($p = 0,001$) e CXCL5 ($p = 0,001$) apresentavam maiores concentrações no grupo endometrioma em relação ao grupo do CEO. O estudo da biologia molecular dos tecidos demonstrou maior expressão gênica de TGF($p = 0,0283$) e CCL5 ($p = 0,0019$) no pacientes com endometrioma em relação ao grupo de CEO. Para as micropartículas apenas CD51/endotélio apresentou maior concentração no grupo de endometrioma em relação ao CEO. **Conclusões:** Nossos resultados demonstram diferenças nas dosagens de citocinas e quimiocinas, micropartículas e na expressão gênica tecidual entre o CEO e endometriomas. A recuperação destes marcadores nos diversos sítios estudados indica uma associação importante da resposta inflamatória com estas patologias e reforça seu importante papel na fisiopatologia de ambas, também, da mais subsídios para o uso destes marcadores como instrumentos de avaliação dos mecanismos envolvidos.

Palavras chave: Quimiocinas, Citocinas, Microparticulas, Câncer de Ovário, Endometriomas, Resposta Inflamatória, CBA (Cytometric Bead Array), RT-qPCR (Reverse transcription polymerase chain reaction).



1. Introdução

Introdução

O câncer de ovário tem sido um grande desafio para a ginecologia nas últimas décadas. Nos Estados Unidos a taxa de mortalidade associada a neoplasia tem se mantido praticamente inalterada desde a década de 30.¹ A patologia apresenta-se de forma insidiosa e em aproximadamente 61% dos casos seu diagnóstico é feito em estádios avançados da doença. Ainda não estão definidos exames de rastreamento ou lesões precursoras para o câncer de ovário.² No Brasil a incidência estimada para 2014 é de 5,58 novos casos para cada grupo de 100 mil mulheres, sendo a oitava neoplasia mais diagnóstica nas mulheres de nosso país.³

A endometriose também representa grande desafio na prática ginecológica. Definida como a presença de glândula e estroma endometrial fora da cavidade uterina tem prevalência muito variável, com taxas entre 5 e 60% de acordo com os métodos de diagnóstico e população estudada.⁴ Apresenta grande pleomorfismo de apresentações clínicas e alterações anatômicas, é considerada patologia crônica, progressiva e pode ter comportamento infiltrativo e mesmo produzir lesões em órgão adjacentes ou a distância.⁵ O endometrioma é a lesão cística produzida em consequência do implante destas células endometriais, é mais frequentemente encontrado nos ovários.⁶

A resposta inflamatória tem sido apontada como fator chave na patogênese do câncer de ovário⁷ e da endometriose, o microambiente associado a estas patologias apresenta mediadores comuns.^{4, 8} Células do Ca interagem com o estroma e modificam ativamente o microambiente para favorecer sua própria progressão.⁹ Dois aspectos fundamentais para o câncer, angiogênese e capacidade de invasão e metástases, são dependentes do microambiente tumoral. O conhecimento desta interação entre tumor e hospedeiro podem direcionar novas abordagens terapêuticas que visem comprometer esta interface.¹⁰ Na endometriose, também, o aumento de citocinas pró inflamatórias está associado a patogênese e progressão da doença.¹¹ Existem características moleculares essenciais compartilhadas por estas patologias, como, habilidade de evitar a apoptose e potencial angiogênico, cujos mecanismos exatos ainda necessitam de maiores esclarecimentos.¹²

Citocinas são proteínas sintetizadas por diversas células e atuam mediante ação em receptores específicos em células alvo, quando liberadas por macrófagos e linfócitos ativados tem ação potencializadora da resposta imune. As quimiocinas são citocinas estruturalmente homólogas associadas a quimiotaxia e quimiotaxia especialmente de células fagocitárias e linfocitárias, desempenhando papel central na resposta inflamatória.¹³ (Fig1)

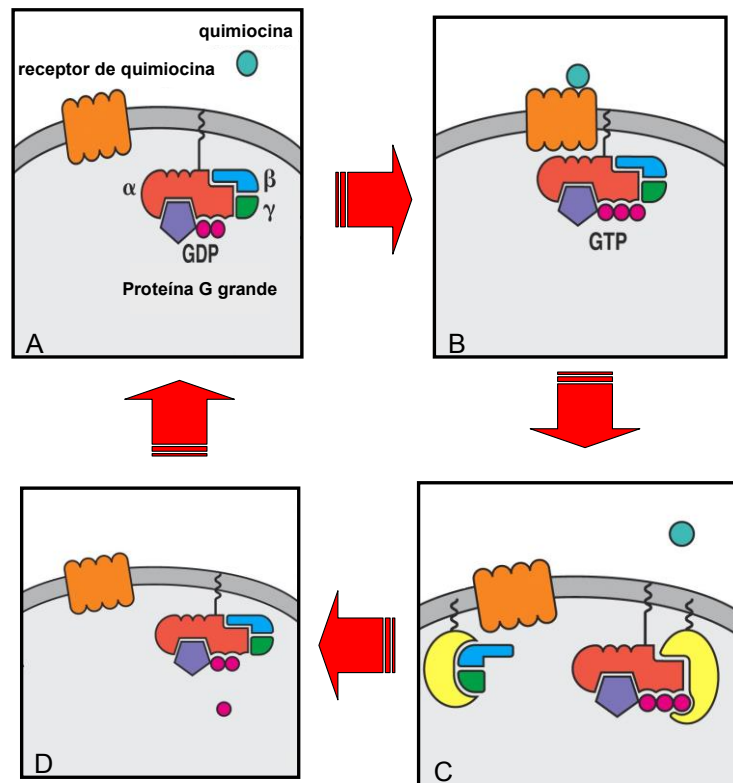


Figura 1 - I
 das quimio
 ção celular
 GDP. **B** -
 Quimiocina se liga ao seu receptor e induz a ligação da proteína G ao receptor e o GDP é trocado por GTP. **C** - A proteína G é dissociada em subunidades α e $\beta\gamma$ que podem ativar outras proteínas na superfície interna da membrana celular.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

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

No Ca de ovário citocinas e quimiocinas formam uma complexa rede de interrelações que tem um profundo impacto no crescimento tumoral, angiogenese e infiltração leucocitária, podendo influenciar de forma determinante o microambiente da neoplasia e influenciar eventos que conduzam a formação de metástases.¹⁴ Na endometriose, o aumento de citocinas pro inflamatórias está associado a patogênese e progressão da doença.¹⁵

Micropartículas de membranas (MPs) ou microvesículas são pequenas vesículas derivadas da membrana celular de diversos tipos de células, têm diâmetro de 30-200nm. (Fig2) Estas estruturas tem sido reconhecidas como importantes mediadoras das interações entre células e podem atuar com carreadoras de fatores biativos em diversos fluidos corporais.¹⁶ As MPs estão associadas a vários processos patológicos e fisiológicos como resposta imune, diferenciação celular, vasculopatias e câncer.¹⁷ A origem celular e o estímulo que desencadeia a formação das MPs pode ser inferido através da análise da quantidade e das características moleculares desta estruturas detectadas na circulação.¹⁸

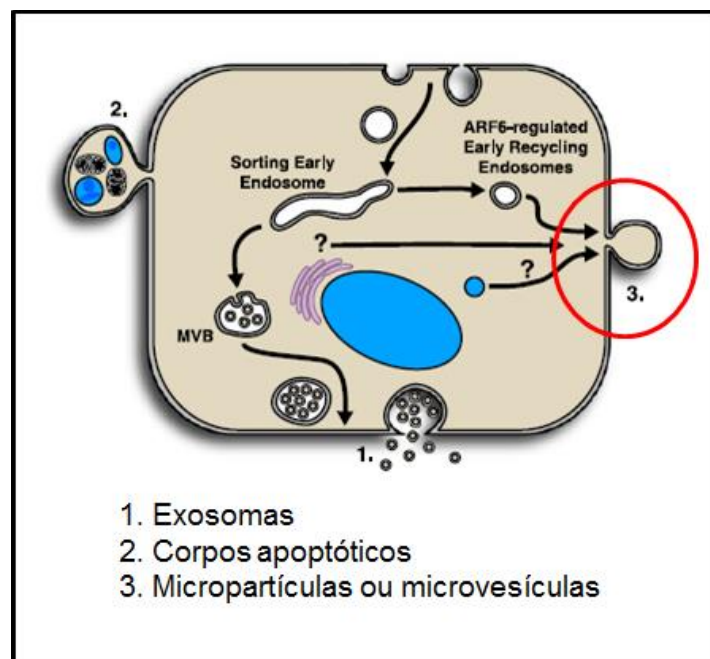


Figura 1 - Representação esquemática da liberação de micropartículas, corpos apoptóticos e exosomas. Adaptado de D'Souza-Chorey C and Clancy GW , 2013

A associação das MPs com a resposta inflamatória e imunidade está estabelecida e vários são os mecanismos envolvidos. Dentre outros, citocinas pró-inflamatórias participam da liberação de MPs, e, estas, liberadas por plaquetas têm papel na produção de citocinas como a IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α que acabam por criar um feedback positivo estimulando a liberação de mais MPs¹⁹. Outro exemplo, MPs de leucócitos relacionam-se atividade proangiogênica e estimulam a expressão das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 e CXCL8. 20²⁰

A análise das semelhanças e diferenças das inter-relações entre hospedeiro e tumor e características da resposta inflamatória, através da análise destes biomarcadores nestas patologias podem permitir um melhor entendimento de seus mecanismos fisiopatológicos e consequentemente contribuir no aprimoramento do rastreamento, diagnóstico e estratégias terapêuticas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar e comparar os achados no plasma, no líquido ascítico e no tecido tumoral de citocinas, quimiocinas e micropartículas em mulheres com CEO e mulheres com endometrioma

2.2. Objetivos específicos

1. Comparar a expressão gênica tecidual de TGF β , IFN γ , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL9 em pacientes com CEO e endometrioma.
 2. Comparar os achados de IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1- β , IL-10, IL-17A, IFN γ , IL-4, IL-2, TGF β , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL 9 e CXCL10 **no plasma, no líquido ascítico e lavado peritoneal** de pacientes com CEO e endometrioma.
 3. Comparar os achados das micropartículas CD66+/neutrófilos, CD45+/leucócitos, CD14+/monócitos, CD235+/eritrócitos, CD51+/endotélio, CD41+/plaquetas, CD3+/linfócitos **no plasma** de pacientes com CEO e endometrioma.
 4. Avaliar a correlação/associação entre os achados de biomarcadores nos diferentes sítios estudados em pacientes com endometrioma, volume da lesão e tempo de evolução da doença.
-

3. Casuística e Métodos

Casuística

Foram avaliadas 60 pacientes com diagnóstico inicial de CEO ou endometriomas ou pacientes submetidas a hysterectomia e ooforectomia para tratamento de doenças ginecológicas benignas, com ovários normais que foram incluídas como controles. Todas atendidas pela equipe de cirurgia ginecológica do Hospital Mater Dei, responsável pelo estudo. O estudo foi submetido à aprovação do CEP e realizado no período entre março de 2010 e outubro de 2013. Foi utilizada uma amostra de conveniência devido à baixa prevalência do CEO e as limitações impostas pelos critérios de inclusão e exclusão utilizados.

Os critérios de inclusão para as pacientes foram: pacientes com diagnóstico de CEO e proposta de tratamento cirúrgico; pacientes com diagnóstico de endometrioma e proposta de tratamento cirúrgico; pacientes com doenças ginecológicas benignas e proposta cirúrgica de hysterectomia abdominal e ooforectomia, entendimento, aceitação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido da paciente, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os critérios de exclusão foram: tratamento prévio com quimioterapia e/ou radioterapia; diagnóstico de doenças do sistema imune e/ou uso de corticóides ou imunossupressores nos últimos 6 meses; presença de evidência à laparotomia de algum processo infeccioso agudo; identificação de neoplasia

maligna, distinta do CEO ao exame anatomopatológico da peça cirúrgica; não concordância da paciente em participar do estudo.

As pacientes foram divididas em 3 grupos: Grupo 1 (CEO): 26 pacientes com diagnóstico de CEO, submetidas a tratamento cirúrgico e anatomopatológico compatível com CEO. Grupo 2 (endometriomas): 18 pacientes com diagnóstico de endometrioma ovariano, submetidas a tratamento cirúrgico e anatomopatológico compatível com endometrioma. Grupo 3 (controle): 16 pacientes submetidas a histerectomia e ooforectomia abdominal e anatomopatológicos compatível com doença benigna ginecológica e ovário sem alterações.

Métodos

Abordagem cirúrgica e coleta material biológico.

Tratamentos cirúrgicos empregados seguiram o protocolo padrão da equipe. Para o grupo de CEO a técnica cirúrgica empregada foi: laparotomia mediana ampla, inventário da cavidade peritoneal, lavado peritoneal, histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral, omentectomia, linfadenectomia pélvica e para-aórtica, procedimento objetivando obtenção de citoredução tumoral ótima. Após o procedimentos as pacientes eram estadiadas conforme os critérios da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia). No grupo de pacientes com diagnóstico de endometriose os procedimentos cirúrgicos empregados foram: vídeo laparoscopia cirúrgica, inventário da cavidade peritoneal, lavado peritoneal, identificação da lesão endometriótica, ooforoplastia e cistectomia, se

necessário, lise de aderências, fulguração de focos de endometriose, abordagem tinha como objetivo o restabelecimento da anatomia pélvica. Todos os procedimentos vídeo laparoscópicos foram laudados com caracterização e descrição detalhada das lesões encontradas.

As peças cirúrgica ovarianas obtidas nos referidos procedimentos cirúrgicos foram divididas em duas porções, a primeira fixada em formaldeído tamponado, incluída em parafina e processada para estudo anatomopatológico, a segunda congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até a extração do RNA para avaliação da expressão gênica das proteínas.

Durante o procedimento cirúrgico, quando encontrado líquido ascítico, foram coletados 20 ml deste material que imediatamente após a coleta seguia ao laboratório para centrifugação e posterior estocagem a -80°C . No grupo de pacientes com endometrioma ou em situações onde não se identificasse ascite, realizava-se lavado peritoneal com 250 ml de soro fisiológico instilados na cavidade abdominal e pélvicas seguido de coleta de 20 ml do material do lavado a ser processado da mesma forma que o líquido ascítico. Também eram coletadas amostras sanguíneas de todas as pacientes no pré-operatório imediato, antes da indução anestésica, material que também sofria centrifugação para posterior estocagem a -80°C . A análise final das amostras para dosagens dos biomarcadores foi realizada apenas após o termino da etapa de coleta.

Avaliação da expressão gênica relativa por RT-qPCR

Essa parte do estudo foi coordenada pela bióloga molecular Dra. Danielle Gomes Zauli.

Extração simultânea de RNA total dos tecidos

Fragmentos de tecido ovariano e endometrial foram coletados e acondicionados adequadamente, em frascos contendo RNA later. Posteriormente, foram armazenados em microtubo RNase-free e mantidos em freezer a -70°C até o momento da extração do material genético.

Posteriormente, realizou-se a extração do material genético utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) que permite obtenção de RNA de alta qualidade. As concentrações de RNA total foram determinadas utilizando o Qubit® Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) utilizando o kit Quant-iT™ RNA Assay Kit, respectivamente (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Com o intuito de verificar a qualidade do material genético extraído, amostras dos tecidos foram também extraídas sob as mesmas condições mencionadas acima e submetidas à eletroforese em gel de agarose sob condições desnaturantes. A análise de integridade mostrou que as amostras avaliadas apresentavam bandas íntegras referentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal.

Além disso, paralelo à determinação da concentração do material genético pelo Qubit® Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

utilizou-se também o espectofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) para determinar o grau de pureza das amostras em relação à presença de proteínas (leitura em absorvância a 260 e 280 nm). Posteriormente, verificou-se que todas amostras do presente estudo apresentaram grau de pureza satisfatório com razão absorvância 260/280 nm acima de 1,8.

Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar - cDNA

A transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit Omniscript Reverse Transcription (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com recomendações sugeridas pelo fabricante. De forma sintética, utilizou-se 50 ng de RNA total previamente extraído, 2 µL de tampão RT 10 vezes concentrado (concentração final 1x), 2 µL de mix dNTP 5 mM (concentração final 0,5 mM), 2 µL de Random primer (concentração final 10 µM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0,25 µL de inibidor de ribonuclease (RNasin) 40 U/µL (concentração final 10 U/20 µL) (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL de Omniscript Reverse Transcriptase 4 U (concentração final 4 U/20 µL) e água RNase-free para um volume final de 20 µL. Em seguida as amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C e posteriormente, armazenadas a temperatura de -20°C até o momento da amplificação por PCR em tempo real.

Eleição de iniciadores

Os iniciadores para os genes avaliados no presente estudo foram selecionados através de levantamento bibliográfico ou desenho manual, de acordo com os seguintes critérios de validação:

1. Conteúdo de C+G entre 50-60%;
2. Tamanho de 18-22 bases;
3. Temperatura de fusão (T_m) entre 58-60°C;
4. Evitou-se utilizar iniciadores com mais de quatro bases em sequência de C e/ou G, e com mais do que 2 C ou G nas cinco últimas bases da extremidade 3';
5. Variação do tamanho dos amplicons de 80 a 200 pares de bases (pb);
6. Sequências que estavam entre junções de exons e introns.

As concentrações senso e anti-senso dos iniciadores selecionados foram estabelecidas através da construção de matrizes de iniciadores (concentração que proporcionou menor C_t e maior ΔR_n), em reações de RT-qPCR com cDNA proveniente de amostras do grupo controle. Além disso, utilizou-se o reagente Power Syber Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e condições de ciclagem universal: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C ou 62°C (IL12B and TNF) por 1 minuto no aparelho StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para cada reação com os iniciadores e ao final de 40

ciclos realizou-se análise da curva de dissociação para verificar ocorrência de possíveis amplificações inespecíficas. Essa análise foi realizada pelo software StepOne versão 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A Tabela a seguir descreve a sequência de nucleotídeos de cada iniciador e o tamanho dos amplicons.

Tabela. Iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

GENES	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDEOS (5'- 3')	TAMANHO AMPLICON	REFERÊNCIA
ACTB	FW: CCGAGCGCGGCTACAGCTTCA RV: GGAAATCGTGCGTGACATTAAG	59bp	(Musso et al., 1996)
IL10	FW: GTGATGCCCAAGCTGAGA RV: CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	138bp	Desenhado pelo grupo
TGFB	FW: CAGCAACAATTCCTGGCGATA RV: AAGGCGAAAGCCCTCAATTT	119bp	Desenhado pelo grupo
IL4	FW: CACAGGCACAAGCAGCTGAT RV: CTCTGGTTGGCTTCCTTCACA	101bp	(Chong et al., 2008)
TNF- alfa	FW: TCTTCTCGAACCCCGAGTGA RV: CCTCTGATGGCACCACCAG	136bp	Desenhado pelo grupo
IFNG	FW: TTCAGCTCTGCATCGTTTTG RV: TCCGCTACATCTGAATGACCT	112bp	(Dhanasekaran et al., 2010)
IL12	FW: TGGAGTGCCAGGAGGACAGT RV: TCTTGGGTGGGTCAGGTTTG	147bp	(Overbergh et al., 2003)
CCL2	FW: AGTCTCTGCCGCCCTTCT RV: GTGACTGGGGCATTGATTG	93bp	(Lin and Chuang, 2010)
CCL3	FW: GCAACCAGTTCTCTGCATCA RV: TGGCTGCTCGTCTCAAAGTA	140bp	(Zhang et al., 2010)
CCL5	FW: CACGCCTCGCTGTCATCCTCA RV: TTGGCGGTTCTTTCGGGTGAC	197bp	Desenhado pelo grupo
CXCL8	FW: GTCTGCTAGCCAGGATCCACAA RV: GAGAAACCAAGGCACAGTGAA	51 pb	(Toki et al., 2009)
CXCL9	FW: CCAATACAGGAGTGACTTG RV: GGATTGTAGGTGGATAGTC	172 pb	(Fernandez, 2008)
CXCL10	FW: GCCAATTTTGTCCACGTGTTG RV: AGCCTCTGTGTGGTCCATCCT	193bp	(Toki et al., 2009)

Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão do controle endógeno

A etapa de validação da estabilidade do gene constitutivo é fundamental em reações de PCR em tempo real, pois garante mais precisão e confiabilidade na quantificação do alvo de interesse. No presente estudo, o gene constitutivo ACTB foi previamente selecionado como controle endógeno. Para verificar a uniformidade de expressão desse gene realizou-se uma reação de RT-qPCR com amostras de cDNA provenientes de cada grupo do estudo. As condições de reação e ciclagem foram estabelecidas na etapa de escolha dos iniciadores e otimização do ensaio.

Posteriormente, os dados gerados foram analisados por comparação da média dos níveis de ciclo threshold (Ct) pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. A análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos avaliados. Sendo assim, o gene ACTB foi escolhido como controle endógeno para as reações de RT-qPCR do presente estudo.

Avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores

A avaliação da eficiência da reação de RT-qPCR para os iniciadores utilizados no presente estudo foi realizada através da construção de curvas-padrão com diluições seriadas de uma amostra de cDNA do grupo controle (1 ng/ μ L a 0,05 ng/ μ L), conforme ensaio otimizado para cada gene alvo (Item 4.9.3.3). Posteriormente, os resultados foram plotados em gráficos onde o eixo X representava o Log da concentração de cDNA e o eixo Y, o valor de Ct para

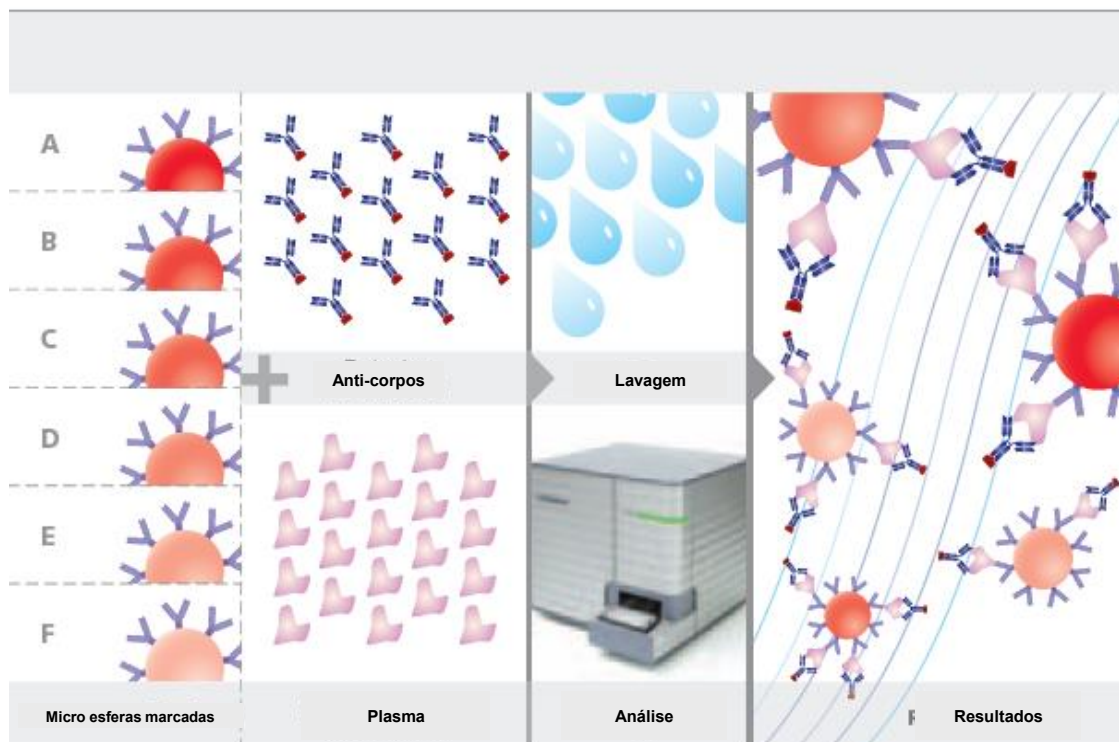
cada concentração. Os primers foram considerados adequados para avaliação da expressão gênica quando apresentavam eficiência acima de 95%, determinada pelo slope da curva aplicado na seguinte fórmula: Eficiência = $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$. Os valores de baseline e threshold foram ajustados para cada ensaio, utilizando-se o software StepOne version 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Deteção dos níveis de expressão gênica de citocinas e quimiocinas por RT-qPCR

Os ensaios para análise da expressão gênica das amostras avaliadas no presente estudo foram realizados utilizando 1,0 ou 2,0 (IL4) μL de cDNA, 12,5 μL de Power Syber Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e concentração específica para cada iniciador (ver Tabela), perfazendo volume final de 25 μL de reação. Os ensaios foram realizados em duplicata com o gene ACTB presente na mesma placa que os demais genes avaliados. Além disso, dois controles internos foram incluídos a fim de verificar contaminação por DNA genômico, bem como pureza dos reagentes (no template control - NTC). Os valores de baseline e threshold foram ajustados para cada ensaio, utilizando o software StepOne version 2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os resultados foram expressos pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct target gene} - \text{Ct ACTB}) \text{ target sample} - (\text{Ct target gene} - \text{Ct ACTB}) \text{ control sample}}$ (Livak et al. 2001).

Avaliação das citocinas e quimiocinas IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1- β , IL-10, IL-17A, IFN γ , IL-4, IL-2, TGF β , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL 9 e CXCL10

As dosagens foram realizadas por meio da técnica de Cytometric bead array (CBA) – ensaio com microesferas fluorescentes empregando-se citometria de fluxo, que se baseia no uso de esferas de poliestireno, como suporte sólido para reação de imunofluorescência, marcadas com diferentes intensidades de fluorescência (FL) 3, marcadas seletivamente com anticorpos anti-analitos de interesse (citocinas e quimiocinas). A análise quantitativa das citocinas e quimiocinas é realizada em função do deslocamento dos grupamentos de microesferas em gráficos de distribuição pontual de FL2 x FL3, obtidos pelo citômetro de fluxo e utilização de curvas-padrão para cada quimiocina avaliada. As análises foram realizadas com o auxílio do software específico para o CBA (BD CBA TM software). A figura 3 mostra a representação esquemática dos procedimentos necessários para dosagem das quimiocinas, empregando-se essa metodologia.



Representação esquemática da dosagem realizada pela técnica CBA

Fig. 3.– Representação esquemática da técnica de CBA.

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

Alíquotas de 25mL de soro diluído 1:5 com diluente G (reagente do kit CBA), alíquotas de 25mL dos padrões de quimiocinas, submetidos à diluição seriada com diluente G (“Top Standard” – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25mL de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon – BD, EUA). Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 15mL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1- β , IL-10, IL-17A, IFN γ , IL-4, IL-2, TGF β , CCL2, CCL5,

CXCL8, CXCL 9 e CXCL10 (Becton Dickinson-BD, EUA), com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500mL da solução F (tampão de lavagem, reagente do kit CBA), centrifugadas a 600g, por 10 minutos, a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então re-incubadas na presença de 20mL do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-quimiocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 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 FACScan (Becton Dickinson, CA, EUA).

Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foram obtidos com base em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Para a análise dos dados as microesferas, conjugadas com anticorpos monoclonais de captura correspondentes a cada quimiocina, foram inicialmente segregadas em gráficos de distribuição pontual de FL-3 x FL-2, onde as cinco esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL-3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL-2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada quimiocina presente na amostra. Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa de quimiocinas séricas, curvas padrão foram

construídas, utilizando-se os dados dos padrões de quimiocinas em concentrações conhecidas (20pg/mL – 5000pg/mL) fornecidas pelo fabricante do kit e empregada para determinar as concentrações de cada quimiocina nos soros testados. Um modelo de ajustamento, através da curva do quarto parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras que não caíam dentro dos limites da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

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

Avaliação das micropartículas.

Obtenção do plasma livre de plaquetas

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

Obtenção das micropartículas (MPs)

A quantificação das MPs no plasma será realizada pela citometria de fluxo adaptada dos protocolos descritos anteriormente (Bode & Hickerson, 2000; Couper et al., 2010). Cem microlitros do PLP serão 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 será ressuspensão no tampão de ligação à anexina 1X (BD Biosciences, California, US). As MPs serão 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” serão 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 será obtida da empresa BD Biosciences, exceto quando mencionado. A caracterização fenotípica das MPs para determinação de sua origem celular será 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 serão incubadas por 30 min. protegidas da luz. As MPs serão ressuspensas em

100 µL do tampão de ligação de Anexina V (BD Pharmingen) e, finalmente, 5 µL de Anexina V/FITC serão adicionados, já que a Anexina V reconhece resíduos de fosfatidilserina que geralmente estão presentes na superfície das MPs.

As amostras serão levadas ao citômetro de fluxo LSR-Fortessa (Becton Dickson - BD, E.U.A.), onde cerca de 100.000 eventos serão obtidos em cada amostra, sendo pelo menos 2.000 eventos dentro da região específica para MPs. As análises serão feitas utilizando o software FlowJo (Tree Star), onde serão construídos dots 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 granulosidade (SSC) (Figura 2A). Além disso, utilizou-se a proteína ligadora de fosfolípedes Anexina V (capaz de reconhecer fosfatidilserinas presentes na superfície das MPs) conjugada com fluoresceína - FITC.

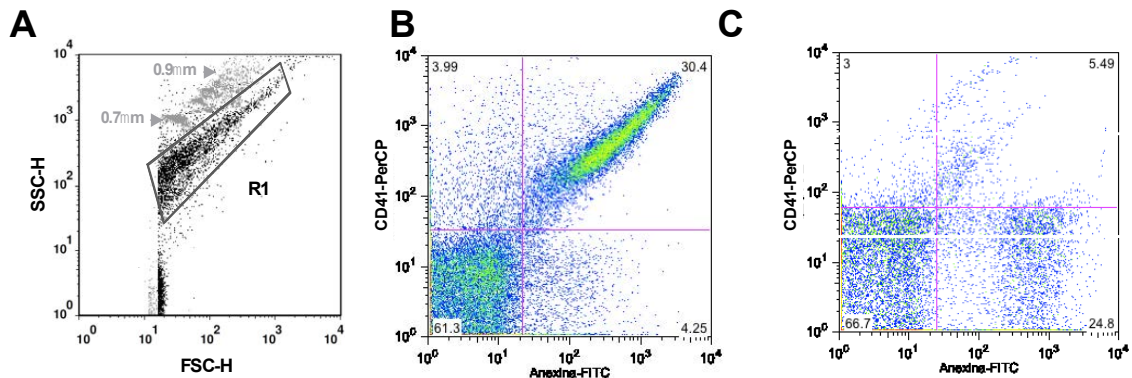


Figura 4: Representação esquemática da seleção de micropartículas em plasma livre de plaquetas. Foram utilizadas microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7 - 0,9 μm) para delimitar a região (R1) correspondente às MPs em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 2A). Além disso, foi utilizada Anexina V conjugada com fluoresceína – FITC versus o marcador de origem das micropartículas. Os resultados foram expressos em frequência percentual do quadrante duplo-positivo referente a presença de micropartículas Anexina V⁺ e o marcador de população celular⁺. No exemplo, temos dois exemplos de resultados da combinação Anexina V-FITC x CD41-PerCP (marcador de plaquetas) (Figuras 4B e 4C, respectivamente).

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no software Stata/SE 12.0. Devido à distribuição assimétrica dos dados foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos, que não possuem como pressuposto a normalidade dos dados.

Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste de Mann-Whitney. Para a análise comparativa entre três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

A associação entre as dosagens de CBA no soro e as dosagens de CBA no líquido ascítico foi investigada por meio do coeficiente de correlação de Spearman (r).

Em todos os testes estatísticos, foram consideradas significativas as diferenças cujo valor p foi inferior a 0,05.



4. Referências

Referências:

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society; 2013.
 2. Kurman RJ, Shih IeM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer – Proposed Inifing Theory. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):433-443.
 3. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. www.inca.gov.br/estimativa
 4. Siufi Neto et al. Cellular Histologic, and Molecular Changes Associated with Endometriosis and Ovarian Cancer. *The Journal Of Minimally Invasive Gynecology. J Minim Invasive Gynecol*. 2014 Jan-Feb;21(1):55-63.
 5. Borghese B, Mondon F, Noël JC, et al. Gene expression. Profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol*. 2008;22:2557-2562.
 6. Muzzi L, Bianchi A, Bellati F, et al. Histologic analysis of endometriomas: what the surgeon needs to know. *Fertility and Sterility*. 2007;87(2):362-366.
 7. Macciò A, Mateddu C. Inflammation and ovarian câncer. *Cytokine* 2012;58(2):133-47.
-

8. Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, et al. Pathogenesis of endometriosis: role of defective “immunosurveillance”. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2007;12:194-202.
 9. Gorelik, E., et al., Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005;14(4): 981-987.
 10. Falcão-Júnior JOA, Teixeira-Carvalho A, Candido EB, et al. Assesement o chemokine serum levels in epithelial ovarian cancer patients. *Tumori* 2013;99:552-556
 11. Yigit R, Figdor CG, Zusterzeel PL, et al. Cytokine analysis as a tool to understand tumor-houst interaction in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(12):1883-1889
 12. Fader AN, Rasool N, Vaziri SA, et al. CCL2 expression in primary ovarian carcinoma is correlated with chemotherapy response and survival outcomes. *Anticancer Res* 2010; 30(12): 4791-4798.
 13. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M. Imunidade Inata: Respostas inatas induzidas por infecção, in *Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença*. Artmed, 2007:630-642.
 14. Kulbe H, Chakravaty P, Leinster De, et al. A dynamic cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res*. 2012;72:66-75.
-

15. Augoulea A, alexandrou A, Crestsa M, et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286:99-103.
 16. Wu ZH, Li H, Qiu GX, et al. Membrane microparticles and diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(18):2420-2427.
 17. Giusti I, D'Ascenzo S, Dolo V. Microvesicles as potential ovarian câncer biomarkers. *Biomed Res Int.* 2013;2013:703048.
 18. D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 2012 Jun 15;26(12):1287-99. doi: 10.1101/gad.192351.112.
 19. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanismis, disease associations and management. *Curr Pharm Des* 2012; 18:1478-1493.
 20. Distler JH, Jungel A, Huber LC, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression. In synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2892-2897
-

5. Artigo 9

Comparative analysis of chemokines and cytokines in women with epithelial ovarian cancer and endometriomas.

Artigo I

Comparative analysis of chemokines and cytokines in women with epithelial ovarian cancer and endometriomas.

Introduction:

Ovarian cancer has been a major challenge for gynecology in recent decades. In the United States, the rate of mortality associated with neoplasia has remained virtually unchanged since the decade of 30.¹ The pathology is insidious and in approximately 61% of cases the diagnosis is made in advanced stages of the disease. Until now there aren't screening tests or precursor lesions to ovarian cancer.² In Brazil, the EOC (Epithelial Ovarian Cancer) estimated incidence for 2014 is 5.58 new cases per 100 thousand women, being the eighth most diagnostic neoplasm in women in our country.³

Endometriosis is also a challenge in the gynecologist practice. Defined as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity, it has variable prevalence, with rates between 5 and 60%, according to the methods of diagnosis and population.⁴ It shows pleomorphic clinical and anatomic presentations, being considered a chronic and progressive pathology. It may have an infiltrative behavior which may result in injury to adjacent or distant organs⁵. Endometrioma is the cystic lesion from endometrial implants, most frequently found in the ovary.⁶

Cytokines are proteins synthesized by many cells and act through specific receptors in target cells. When released by activated lymphocytes and macrophages will potencialize the immune response. Chemokines are cytokines structurally homologous, mainly associated with chemokinesis and chemotaxis of phagocytic and lymphocytic cells. They play a central role in inflammatory response.⁷

The inflammatory response has been seen as a key factor in the pathogenesis of ovarian cancer and endometriosis⁸. The microenvironment associated with these pathologies share many cytokines and other mediators.⁴ ⁹ Cytokines and chemokines form a complex network of interrelationships in ovarian cancer that have a profound impact on tumor growth, angiogenesis and leukocyte infiltration. They may have greater influence on the tumor microenvironment and lead the formation of metastases.¹⁰ The increase of pro-inflammatory cytokines in endometriosis is associated with the pathogenesis and progression of the disease.¹¹

The analysis of the similarities and differences of cytokines and chemokines related to this pathology may allow a better understanding of its pathophysiology and thus contribute to the improvement of screening, diagnosis and therapeutic strategies. The objective of this study is to evaluate and compare the tissue gene expression of TGF β , IFN γ , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL9 in patients with endometrioma and EOC and also evaluate and compare the findings of IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1- β , IL-10, IL-17A, IFN γ , IL-4, IL-2, TGF β , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL 9 e CXCL10 in plasma, ascites and peritoneal washings of patients with endometrioma and EOC.

Patients and Methods:

Sixty patients were evaluated. At first, were included patients diagnosed with EOC (Epithelial Ovarian Cancer) or endometriomas, and, later, patients undergoing hysterectomy and oophorectomy for treatment of benign gynecological diseases, with normal ovaries, who were included in control group. The study was conducted from March 2010 to October 2013, following the Ethical Committee guidelines of the institution, including an informed consent provided by all patients involved in the investigation. A convenience sample was used due to the low prevalence of the EOC and the limitations imposed by the inclusion and exclusion criteria used.

The inclusion criteria for patients were: patients with EOC and proposed surgical treatment, patients with endometrioma and proposed surgical treatment, patients with benign gynecological diseases and surgical proposal for abdominal hysterectomy and oophorectomy. Agreement and signature of the informed consent of the patient, according to Resolution 196/96 of the National Health Council.

Exclusion criteria were: 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; disagreement of the patient to participate.

The patients were set in three groups: Group 1 (EOC): 26 patients diagnosed with EOC; Group 2 (endometriomas): 18 patients diagnosed with ovarian endometrioma; Group 3 (control): 16 patients undergoing abdominal hysterectomy and oophorectomy for benign gynecologic disease and normal ovary.

The EOC patients were submitted to laparotomy and debulking surgery, and the tumor staging was performed according the FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) recommendations. The endometrioma group were submitted to laparoscopy and cystectomy of the endometriomas, and were staged according ASRM (American Society for Reproductive Medicine) revised classification -1996.

The ovarian surgical samples obtained in these surgical procedures were divided into two parts: the first, was fixed in buffered formaldehyde, included in paraffin and processed for histopathologic examination; the second, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction to evaluate gene expression of proteins.

When ascites was found, 20 ml was collected and immediately sent to laboratory for centrifugation and storage at - 80°C. For patients with endometrioma, or without ascites, was realized peritoneal washings with 250 ml of saline instilled in the abdominal and pelvic cavity and recovered 20 ml, to be processed in the same way of the ascites. Blood samples were also collected for all patients in the immediate preoperative period, before induction of anesthesia. The material was also sent to centrifugation for subsequent

storage at - 80 ° c. The final samples analysis for determination of biomarkers were performed only after the end of the collection phase.

The IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1- β , IL-10, IL-17A, IFN γ , IL-4, IL-2, TGF β , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL 9 and CXCL10 at serum, ascites and peritoneal fluid, were quantified using the system Cytometric Bead Array (CBA) (Becton Dickinson, BD). This method use a mixture of polystyrene spheres of different intensities of fluorescence, coated with specific antibodies for the human chemokines that are detected in fluorescence channel 3 (FL-3). This methodology allows the simultaneous assessment of multiple cytokines and chemokines in the same assay, using minimum sample volume.

Tissue samples for evaluation of gene expression of TGF β , IFN γ , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 and CXCL9 used the technique of nucleic acid extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-time PCR.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Stata / SE 12.0 software. Non-parametric statistical tests were used due to the non-normal distributed data.

For comparative analysis between two groups, were used the Mann-Whitney test. For the comparative analysis among the three groups was used the Kruskal-Wallis test followed by post-test, Mann-Whitney test with Bonferroni correction.

The association between serum measurements of CBA and CBA measurements of ascites and peritoneal fluid was investigated using the Spearman correlation coefficient (r).

$P < 0,05$ was considered statistically significant for all analyses.

Results

The mean age of patients in the groups EOC, endometrioma and control were respectively 62 (+ 14.06) years, ranging from 29 to 86 years; 37 (+ 10.31) years, ranging from 25 to 62 years, and 40.2 (+ 8.87) years, ranging from 27 to 56 years. The average parity of the patients was 3.5 (\pm 1.99) deliveries for the EOC group, ranging from 0 to 7 deliveries. In the group of endometriomas the average rate was 0.47 (+ 0.84) deliveries ranging from 0 to 3 births. For the control group the mean parity was 2.2 (+1.68) deliveries, ranging from 0 to 5.

Patients with ovarian cancer were staged according to the FIGO recommendation. Ten patients were identified as I and II, and 16 as III / IV . The staging of patients with endometriomas were performed according to the ASRM classification (American Society for Reproductive Medicine) identifying 15 patients as stage III and 3 patients as stage IV.

In relation to the Endometrioma group, was determined the time elapsed between the onset of symptoms until surgical treatment and the maximum diameter of the endometrioma defined in the surgical approach. The average reported time to onset of symptoms was 24 months (\pm 23.75) ranging from 1 to 96 months. The maximum diameter of the lesions was 4 (\pm 2.34) cm, ranging from 1 to 10 cm.

Table 1 - General characteristics.

	Age	Parity	Staging	Time of the symptoms' onset	Maximum diameter
	Mean (SD) range years	Mean (SD) range years	Patients	Mean (SD) range months	Mean (SD) range Cm
EOC Group			FIGO		
n 26	62(+14,0)29-86	3,5(+1,9) 0-7	I/II 10 III/IV 16		
Endometrioma Group			ASRM		
n 18	37(+10,3) 25-67	0,4(+0,8) 0-3	III 15 IV 3	24(+23,7) 1-96	4(+2,3) 1-10
Control Group					
n 16	40(+8,8) 27-56	2,2(+1,6) 0-5			

SD - Standard Deviation.

FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics.

ASRM – American Society for Reproductive Medicine.

Analyses of serum assay showed a higher concentration of 6 biomarkers in patients with EOC. In this group, the cytokines IL6, IL10 and chemokines CXCL8, CCL2 demonstrated serum levels significantly higher than in the control group, and the cytokine IL6 with the chemokines CXCL9, CXCL10 showed higher concentrations compared to the group of endometrioma. (Fig. 1) In the other analyzes of the patients' serum no significant differences between groups were found.

Figure 1.

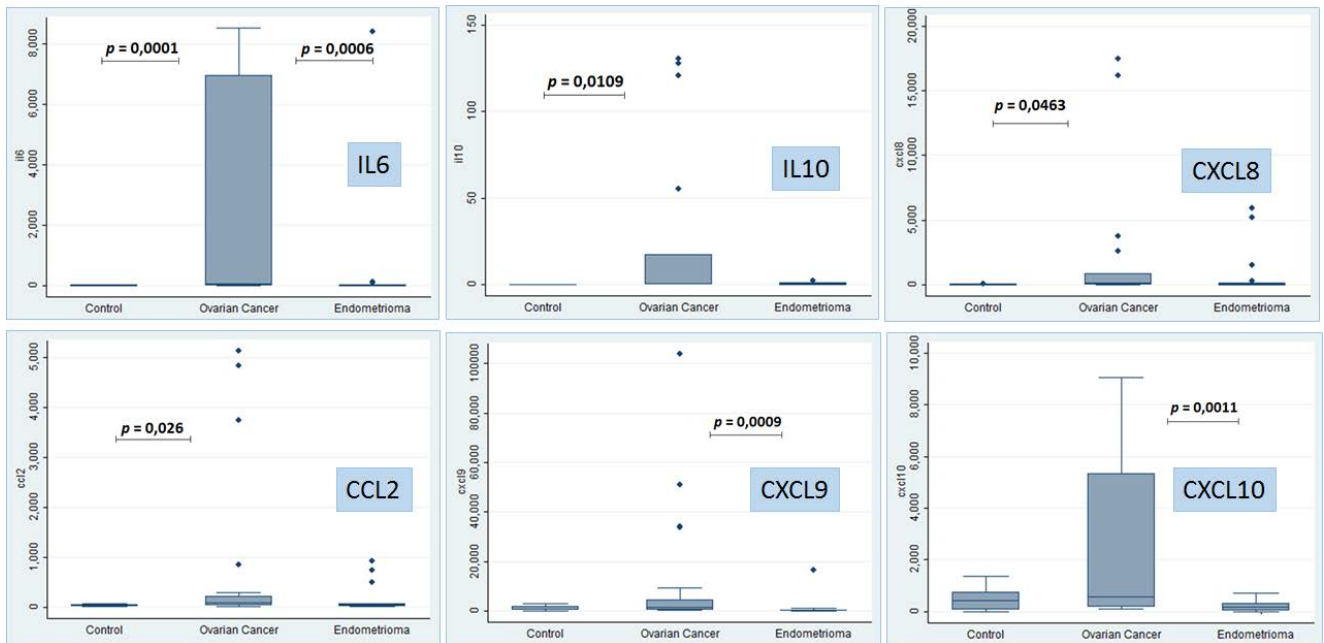


Fig 1. - IL6, IL10, CXCL8, CCL2, CXCL9 and CXCL10 have significantly higher plasma concentrations in patients with EOC.

Ascites and peritoneal washings analyzes demonstrated statistically significant results for CCL2, CCL5 and IL8, which had higher concentrations only in Endometrioma group, compared to EOC group. (Fig. 2)

Figure 2.

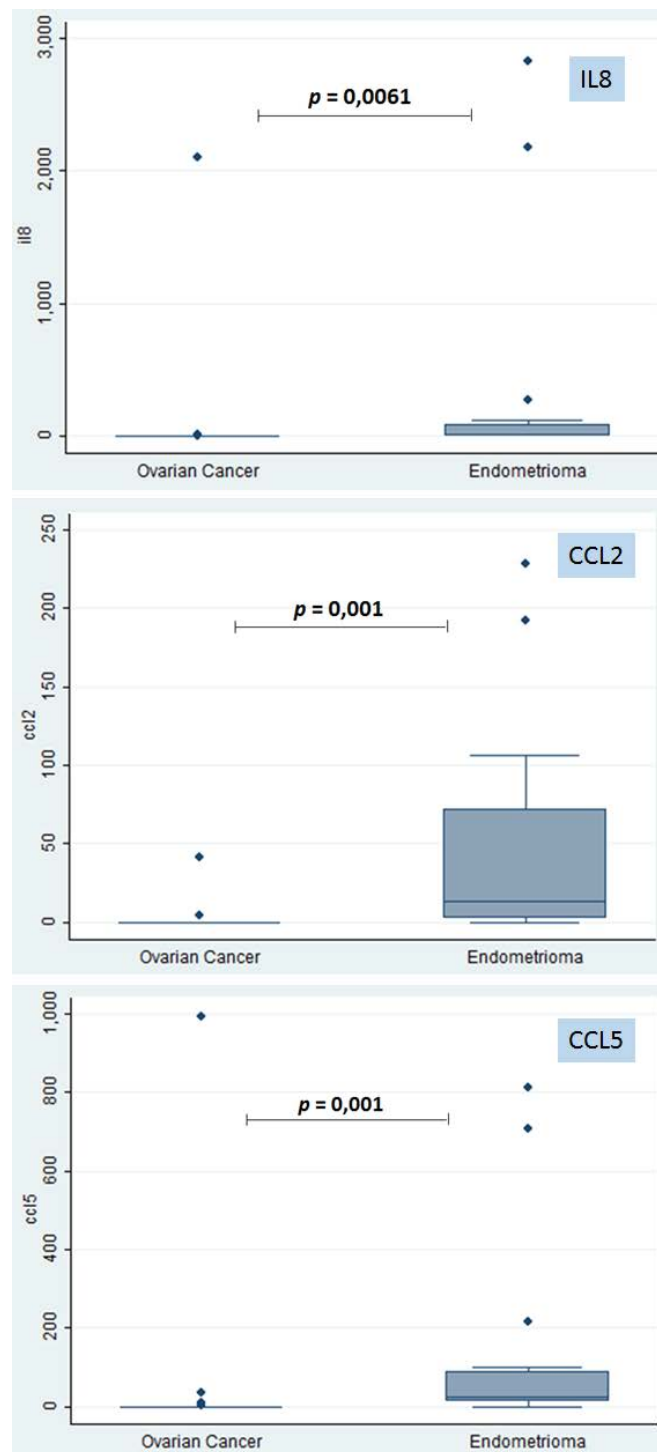


Fig.2 - The concentrations of IL8, CCL2 and CCL5 were higher in the Endometrioma group than in the EOC group.

The results of tissue samples showed a higher gene expression of TGFβ and CCL5 in patients with endometrioma. (Fig. 3) In the tissue, IFN γ, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8 and CXCL9 dosages were similar between the groups.

Figure 3.

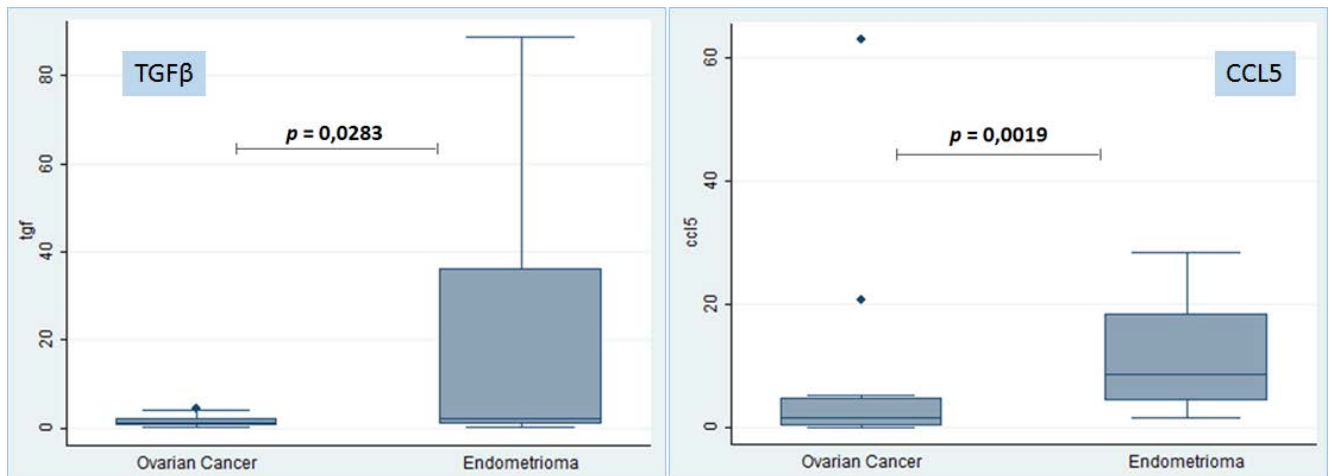


Fig.3 - The gene expression of TGFβ and CCL5 were higher in the Endometrioma group than in the EOC group .

The analysis of possible associations between biomarkers and age of patients has not identified any significant correlation. The same was observed for the clinical parameters evaluated in the Endometrioma group. The maximum diameter of the lesions and the time from the onset of the symptoms to surgical therapy had no statistically significant associations.

Discussion

Ovarian cancer and endometriosis, despite their importance, are still involved in great questionings, which imposes significant barriers to improving the management of patients affected by these diseases. Several theories attempt to explain the etiology of both, but we can now say that a single theory cannot explain all cases of endometriosis or EOC, and it is reasonable to assume that a sum of aspects of these theories may be at the origin of these pathologies and its various forms of presentation. Moreover, it is observed that

these theories converge with greater or lesser intensity for an important role of the inflammatory response in their pathophysiology.^{12, 13}

The present study has unique characteristics. Three biological sites were evaluated: serum, ascites or peritoneal fluid and tissue samples of the lesions. In the first two, 15 parameters were analyzed, IL-12p70, TNF, IL-6, IL-1- β , IL-10, IL-17A, IFN γ , IL-4, IL-2, TGF β , CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL 9 and CXCL10. Eight parameters of the tissue gene expression, TGF β , IFN γ , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL9, were analyzed in the tissue. The dosages were compared with the endometrioma group, EOC group and control group.

Several studies have tried to demonstrate the association of cytokines and chemokines with the EOC. Large number of these markers have been evaluated, for example: IL1b, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IFN γ , TNF- α , TNF β , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 and CXCL12. The findings of these studies are not uniform, since there are differences in the associations found and in their characteristics.^{14, 15,16}

Some of these markers are often associated with the EOC, as IL6 and CCL2,^{12,16,17, 18} which, in this study, showed higher concentrations in the serum of patients with EOC compared to control group . It has been observed an increased concentration of IL-6 in patients with ovarian cancer.^{12,18} Lane D, 2011 showed higher concentrations of IL-6 in the ascites, which was not identified in our results. The author showed correlation with shorter disease-free survival and cytokine.¹⁹ In literature, CCL2 has similar results to this study, but also, shows discordant results.^{14, 15,17} The repeated findings of these

biomarkers, associated with the EOC, point out to the importance of their metabolic pathways and may indicate a predominance of these in the pathophysiology of ovarian cancer.

Our results have also identified a significant serum increase of IL 10, CXCL 8, CXCL 9 and CXCL 10 in patients with the EOC. CXCL 8 is a chemokine produced mainly by monocytes, macrophages, fibroblasts, keratinocytes, and endothelial cells and their main effects are the mobilization, activation and degranulation of neutrophils, as well as angiogenesis. IL-10 is produced by T cells, macrophages, activated B cells being considered a potent suppressive of macrophages' function.⁷ Also, CXCL 9 and CXCL 10 have angiostatic activity, and are associated with an inhibition of the progression of EOC.²¹

The differences in findings and possible inconsistencies among the various studies may be due to differences in groups, different analysis techniques, sample size, and may represent different molecular mechanisms used by various groups of patients with cancer, for modulating the interrelationship tumor-host.

In the analysis of ascites and peritoneal washings, we identified an increase in IL8, CCL2 and CXCL5 in patients with endometrioma compared to the group EOC. The increase of CCL2 and IL8 had been previously described,^{22,23} and, also in endometriosis, literature shows controversial findings for these cytokines.¹⁸ Noteworthy, IL6 was not associated with endometrioma in

any of our analyses, but is strongly associated with endometriosis in the literature.^{23, 24,25}

We also identified a greater tissue gene expression of TGF β and CCL5 in patients with endometrioma. CCL5 is associated with both chronic inflammation and active Tcells, and acts on basophil degranulation. TGF β is produced by chondrocytes, monocytes and Tcells and is mainly related to inhibition of cell growth being considered an antiinflammatory agent.⁷ No correlations were identified between data obtained in the different biological sites studied.

We observed significant serum markers with the EOC group and other different markers with significant values in ascites, peritoneal washings and tissue samples in the Endometrioma group. Several factors may be linked to these findings, however, is not yet possible to define the biomolecular mechanism involved. It can be argued that the EOC and endometriosis have micro-environments that share similar cytokines and mediators.²⁶ However, the results point out to differences in modulation of cellular microenvironment between the two pathologies. Grasping the particularities of these differences may help to understand the pathophysiology and characteristics that determine the progression of these diseases.

Further studies with larger numbers of patients will be needed to define the role of cytokines in ovarian cancer and endometriomas. Multicentric series may be necessary, especially given the low prevalence of ovarian cancer. Study Groups with larger samples would allow greater stratification of patients, an important aspect since it has been demonstrated that the EOC includes

diseases with different molecular, morphological and genetic characteristics, and may also have distinct cellular origin.² More patients also would allowed an analysis of other presentations of endometriosis, such as peritoneal endometriosis or severe endometriosis, which seem to have different behavior, as already shown in other studies .²³

The knowledge of bioactive substances related to the immune system and inflammatory response mechanisms may open the prospect of identifying high-risk groups to the EOC, to the development of more severe forms of endometriosis or even to a malignant transformation. It may be possible to identify specific pathways that can be blocked or activated to help control and combat the EOC. Studies with anti-TNF antibodies represent this possibility and present promising results.¹⁰

Maybe, the future is in understanding the various mechanisms involved and the different pathways used by tumor in each individual, allowing individualized treatment for each patient and each tumor, benign or malignant, based on the inter-relationships that each individual specifically states with the tumor.

We conclude, with the data presented, that there is a difference in the expression of cytokines and chemokines in patients with endometrioma and EOC. These biomarkers may play a role in the diagnosis and treatment of both conditions.

Referências:

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society; 2013.
 2. Kurman RJ, Shih IeM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer – Proposed Inifying Theory. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar;34(3):433-443.
 3. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. www.inca.gov.br/estimativa
 4. Siufi Neto et al. Cellular Histologic, and Molecular Changes Associated with Endometriosis and Ovarian Cancer. *The Journal Of Minimally Invasive Gynecology. J Minim Invasive Gynecol.* 2014 Jan-Feb;21(1): 55-63.
 5. Borghese B, Mondon F, Noël JC, et al. Gene expression. Profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol.* 2008;22:2557-2562.
 6. Muzzi L, Bianchi A, Bellati F, et al. Histologic analysis of endometriomas: what the surgeon needs to know. *Fertility and Sterility.* 2007;87(2): 362-366.
 7. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M. Imunidade Inata: Respostas inatas induzidas por infecção, in *Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença.* Artmed, 2007:630-642.
-

8. Musrap N, Diamandis EP. Revisiting the complexity of the ovarian cancer microenvironment – clinical implications for treatment strategies. *Mol Cancer Res*, 2012;10(10):1254-64.
 9. Worley Jr MJ, Welch WR, Berkowitz RS, Ng S. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: A Review of Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:5367-5379.
 10. Kulbe H, Chakravaty P, Leinster De, et al. A dynamic cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res*. 2012;72:66-75.
 11. Augoulea A, alexandrou A, Crestsa M, et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286:99-103.
 12. Macciò A, Mateddu C. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine* 2012;58(2):133-47.
 13. Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinouadaki I, et al. Pathogenesis of endometriosis: role of defective “immunosurveillance”. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2007;12:194-202.
 14. Gorelik, E., et al., Multiplexed immunobead-based cytokine profiling for early detection of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005;14(4): 981-987.
-

15. Falcão-Júnior JOA, Teixeira-Carvalho A, Candido EB, et al. Assesment o chemokine serum levels in epithelial ovarian cancer patients. *Tumori* 2013;99:552-556
 16. Yigit R, Figdor CG, Zusterzeel PL, et al. Cytokine analysis as a tool to understand tumor-houst interaction in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(12):1883-1889
 17. Fader AN, Rasool N, Vaziri SA, et al. CCL2 expression in primary ovarian carcinoma is correlated with chemotherapy response and survival outcomes. *Anticancer Res* 2010; 30(12): 4791-4798.
 18. Daraï E, Detchev R, Hugol D, Quang NT. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod.* 2003 Aug;18(8):1681-1685.
 19. Lane D, et al. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites in ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2011;30(11):210
 20. Negus, R.P., et al., The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* 1995; 95(5):2391-2396.
 21. Rainczuk A, Rao J, Gathercole J, et al. The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. *Reproduction* 2012; 144(3): 303-317.
-

22. Agic A, Djalali S, Wolfler MM, et al. Combination of CCR1 mRNA, MCP1, and CA125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. *Reprod Sci* 2008;15(9):906-11
 23. Carmona F, Chapron C, Martínez-Zamora MÁ, et al. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. *J Reprod Immunol.* 2012;95(1-2):80-86.
 24. Wickiewicz D, Chrobak A, Gmyrek GB, et al. Diagnostic accuracy of interleukin-6 levels in peritoneal fluid for detection of endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Oct;288(4):805-14.
 25. Barcz E, Milewski Ł, Dziunycz P, et al. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. *Fertil Steril.* 2012 Jun;97(6):1380-6.
 26. Worley-Jr MJ, Welch WR, Berkowitz RS, et al. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: A Review of Pathogenesis. *Int J Mol* 2013; 14: 5367-5379.
-

6. Artigo 99

**Comparative analysis of membrane microparticles expression
in patients with ovarian cancer and endometriomas.**

Artigo II

Comparative analysis of membrane microparticles expression in patients with ovarian cancer and endometriomas.

Introduction:

Ovarian cancer has been a major challenge for gynecology in recent decades. In the United States, the rate of mortality associated with neoplasia has remained virtually unchanged since the decade of 30.¹ The pathology is insidious and in approximately 61% of cases the diagnosis is made in advanced stages of the disease. Until now there aren't screening tests or precursor lesions to ovarian cancer.² In Brazil, the EOC (Epithelial Ovarian Cancer) estimated incidence for 2014 is 5.58 new cases per 100 thousand women, being the eighth most diagnostic neoplasm in women in our country.³

Endometriosis is also a challenge in the gynecologist practice. Defined as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity, it has variable prevalence, with rates between 5 and 60%, according to the methods of diagnosis and population.⁴ It shows pleomorphic clinical and anatomic presentations, being considered a chronic and progressive pathology. It may have an infiltrative behavior which may result in injury to adjacent or distant organs⁵. Endometrioma is the cystic lesion from endometrial implants, most frequently found in the ovary.⁶

Microparticles membranes (MPs) are small vesicles or microvesicles derived from cell membranes of different types of cells, with 30-200 nm diameter. These structures have been recognized as important mediators of cell interactions and may serve as a disseminated storage pool of circulating bio-effectors.⁷ MPs are associated with various pathological and physiological processes such as immune response, cell differentiation, vascular disorders, and cancer.⁸ The origin cell and the stimulus that triggers the formation of MPs can be inferred by analyzing the quantity and characteristics of molecular structures detected in body fluids.⁹

The association of MPs with the inflammatory response and immunity is already established and several mechanisms are involved. Among others, proinflammatory cytokines participate in the release of MPs, and these, released by platelets play a role in the production of cytokines such as IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α that ultimately create a positive feedback, stimulating the release of more MPs¹⁰. Another example, leukocyte MPs have proangiogenic activity and stimulate the expression of the chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8 and CXCL6.¹¹

The inflammatory response has been seen as a key factor in the pathogenesis of ovarian cancer and endometriosis¹². The microenvironment associated with these pathologies share many cytokines and other mediators.^{4,13} Cancer cells interact with stromal and actively modify the microenvironment for its own progression.¹⁴ Key elements in cancer, angiogenesis, invasiveness and metastasis are dependent on the tumor

microenvironment. Knowledge of this interaction between tumor and host may lead to a new therapeutic approach aimed at compromising this interface.¹⁵ For endometriosis the pro-inflammatory cytokines increase is associated with the pathogenesis and progression of the disease¹⁶. There are essential molecular characteristics shared by these pathologies, such as, ability to prevent apoptosis and potential angiogenic, which exact mechanisms still need further studies to be clarified.¹⁷

The study of MPS in these pathologies and the analysis of the similarities and differences of the interrelationships between host and tumor, as well as the characteristics of inflammatory response, may allow a better understanding of its pathophysiology and thus contribute to the improvement of screening, diagnosis and therapeutic strategies. The objective of this study is to evaluate and compare the findings of microparticles CD66 + / neutrophils, CD45 + / leukocytes, CD14 + / monocytes, CD235 + / erythrocytes, CD51 + / endothelium, CD41 + / platelets, CD3 + / lymphocytes in the plasma of patients with CEO and endometrioma.

Patients and Methods:

Sixty patients were evaluated. At first, were included patients diagnosed with EOC (Epithelial Ovarian Cancer) or endometriomas, and, later, patients undergoing hysterectomy and oophorectomy for treatment of benign gynecological diseases, with normal ovaries, who were included in control group. The study was conducted from March 2010 to October 2013, following

the Ethical Committee guidelines of the institution, including an informed consent provided by all patients involved in the investigation. A convenience sample was used due to the low prevalence of the EOC and the limitations imposed by the inclusion and exclusion criteria used.

The inclusion criteria for patients were: patients with EOC and proposed surgical treatment, patients with endometrioma and proposed surgical treatment, patients with benign gynecological diseases and surgical proposal for abdominal hysterectomy and oophorectomy. Agreement and signature of the informed consent of the patient, according to Resolution 196/96 of the National Health Council.

Exclusion criteria were: 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; disagreement of the patient to participate.

The patients were set in three groups: Group 1 (EOC): 26 patients diagnosed with EOC; Group 2 (endometriomas): 18 patients diagnosed with ovarian endometrioma; Group 3 (control): 16 patients undergoing abdominal hysterectomy and oophorectomy for benign gynecologic disease and normal ovary.

The EOC patients were submitted to laparotomy and debulking surgery, and the tumor staging was performed according the FIGO (International

Federation of Gynecology and Obstetrics) recommendations. The endometrioma group were submitted to laparoscopy and cystectomy of the endometriomas, and were staged according ASRM (American Society for Reproductive Medicine) revised classification -1996.

For the analysis of MPs in plasma, whole blood samples collected in anticoagulant tubes containing sodium citrate were subjected to centrifugation (600 xg) for 15 minutes at RT to obtain platelet poor plasma (PPP). The PPP will again centrifugate for 3 min (13,000 xg) at 4 ° C to obtain platelet-free plasma (PLP) which will be stored at -70°C until ready to use.

The quantification of MPs in plasma was performed by flow cytometry protocol adapted from previously described literature^{18, 19}. One hundred microliters of PLP were diluted in PBS solution containing citrate and heparin (1 / ml) (1:3 dilution) and again centrifuged for 90 minutes at 14,000 xg at 15 ° C. The rich pellet was resuspended in MPs in 1X annexin binding (BD Biosciences, California, U.S.) buffer. The MPs were quantified by flow cytometry by calibration "microbeads" fluorescent (Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, U.S.) of defined size (0.7 to 0.9 μm). Ten microliters of "beads" were added to 100 mL of sterile 1X PBS.

The phenotypic characterization of MPs, to determine their cellular origin, was performed by incubating plasma containing 100 mL of MPs with antibodies specific for neutrophils (CD66/PE), T lymphocytes (CD3/PE), platelets (CD41a/PerCP), leukocytes (CD45/APC), monocytes (CD14/PerCP), erythrocytes (CD235a/PECy5) and endothelial cells (CD51/61/PE), obtained

from the company BD Biosciences. After addition of antibodies, the samples were incubated for 30 min., protected from light. The MPs were resuspended in 100 mL of Annexin V-binding (BD Pharmingen) buffer, and finally 5 μ L of Annexin V / FITC was added as Annexin V recognizes phosphatidylserine residues, that are generally present on the surface of MPs.

The samples were brought to the flow cytometer LSR-Fortessa (Becton Dickson - BD, USA), where about 100,000 events were collected for each sample, at least 2,000 events within the specific region to MPs. The analyzes were performed using FlowJo (Tree Star) software, and built dots plots of all markers used versus Annexin / FITC, thus allowing the identification and quantification of each specific population of MPs. (Figure 2A)

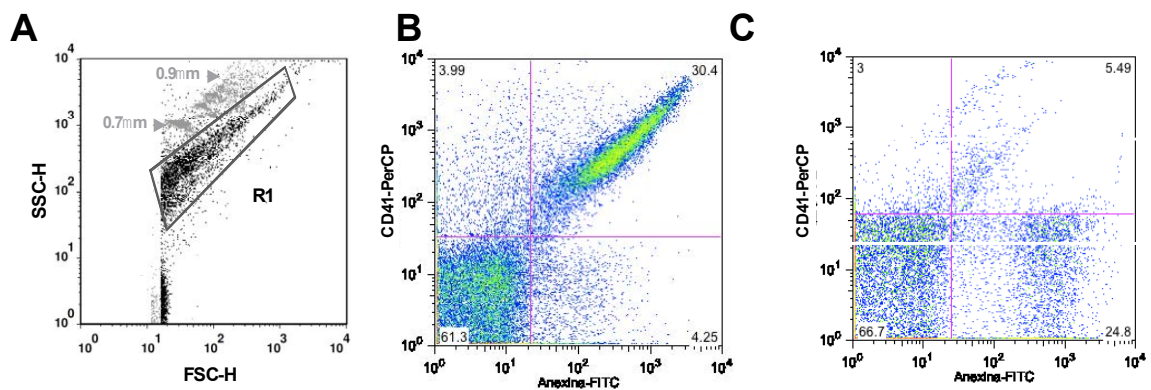


Figure 2: Schematic representation of the selection of microparticles in platelet-free plasma. Fluorescent microspheres of defined size (0.7 to 0.9 μ m) were used to delimit the region (R1) corresponding to the graphs of MPs in size (FSC) versus granularity (SSC) (Figure 2A). FITC versus the marker origin of the microparticles - Furthermore, Annexin V conjugated with fluorescein was

used. Results were expressed as percentages of double positive quadrant regarding presence of microparticles Annexin V + and cell marker + population. In the example, are two examples of results from the combination Annexin V-FITC CD41-PerCP x (platelet marker) (Figures 2B and 2C, respectively).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Stata / SE 12.0 software. Non-parametric statistical tests were used due to the non-normal distributed data.

For comparative analysis between two groups, were used the Mann-Whitney test. For the comparative analysis among the three groups was used the Kruskal-Wallis test followed by post-test, Mann-Whitney test with Bonferroni correction.

$P < 0,05$ was considered statistically significant for all analyses.

Results

The mean age of patients in the groups EOC, endometrioma and control were respectively 62 (+ 14.06) years, ranging from 29 to 86 years; 37 (+ 10.31) years, ranging from 25 to 62 years, and 40.2 (+ 8.87) years, ranging from 27 to 56 years. The average parity of the patients was 3.5 (\pm 1.99) deliveries for the EOC group, ranging from 0 to 7 deliveries. In the group of endometriomas the

average rate was 0.47 (+ 0.84) deliveries ranging from 0 to 3 births. For the control group the mean parity was 2.2 (+1.68) deliveries, ranging from 0 to 5.

Patients with ovarian cancer were staged according to the FIGO recommendation. Ten patients were identified as I and II, and 16 as III / IV . The staging of patients with endometriomas were performed according to the ASRM classification (American Society for Reproductive Medicine) identifying 15 patients as stage III and 3 patients as stage IV.

In relation to the Endometrioma group, was determined the time elapsed between the onset of symptoms until surgical treatment and the maximum diameter of the endometrioma defined in the surgical approach. The average reported time to onset of symptoms was 24 months (\pm 23.75) ranging from 1 to 96 months. The maximum diameter of the lesions was 4 (\pm 2.34) cm, ranging from 1 to 10 cm.

Table 1 - General characteristics.

	Age	Parity	Staging	Time of the symptoms' onset	Maximum diameter
	Mean (SD) range years	Mean (SD) range years	Patients	Mean (SD) range months	Mean (SD) range Cm
EOC Group			FIGO		
n 26	62(+14,0) 29-86	3,5(+1,9) 0-7	I/II 10 III/IV 16		
Endometrioma Group			ASRM		
n 18	37(+10,3) 25-67	0,4(+0,8) 0-3	III 15 IV 3	24(+23,7) 1-96	4(+2,3) 1-10
Control Group					
n 16	40(+8,8) 27-56	2,2(+1,6) 0-5			

SD - Standard Deviation.

FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics.

ASRM – American Society for Reproductive Medicine.

The analyzes of plasma microparticles in 3 groups showed no significant differences for MP CD66 + / neutrophils ($p = 0.564$), CD45 + / leukocytes ($p = 0.845$), CD14 + / monocytes ($p = 0.612$), CD235 + / erythrocytes ($p = 0.096$), CD41 + / platelets ($p = 0.855$) and CD3 + / lymphocytes ($p = 0.840$). Only for CD51 + / endothelium was identified significant differences between the groups CEO and endometrioma ($p = 0.024$). (Fig. 1 and 2)

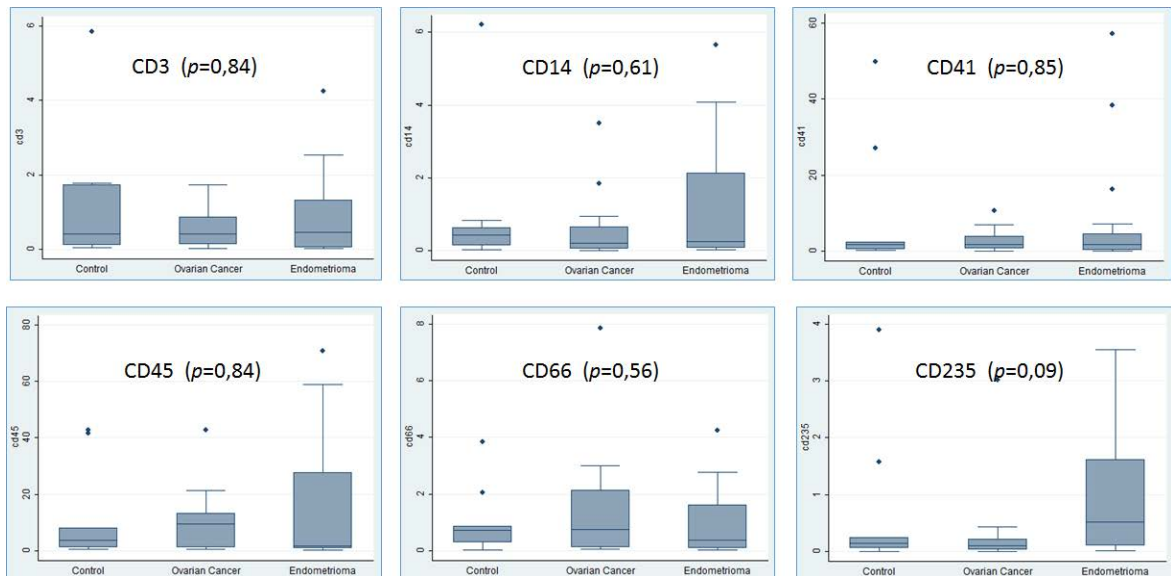


Figure 1 - Evaluation of microparticle CD66 + / neutrophils, CD45 + / leukocytes, CD14 + / monocytes, CD235 + / erythrocytes, CD41 + / CD3 + and platelet / lymphocyte among Control Group, Group EOC and Group Endometrioma.

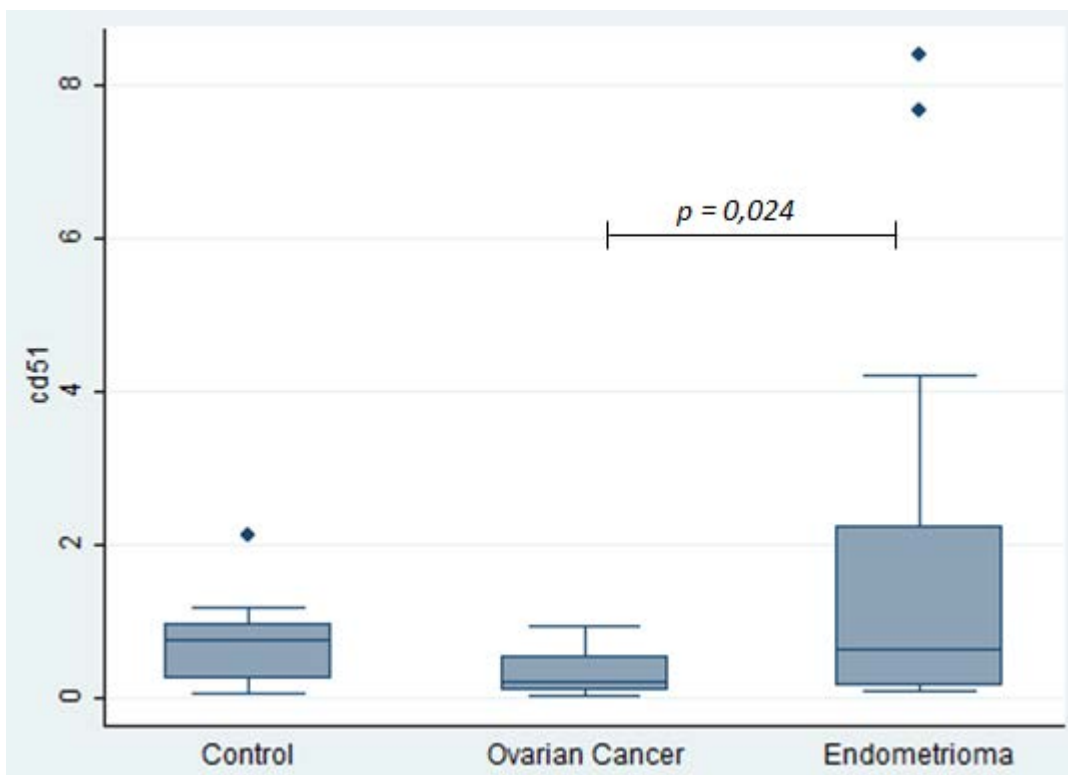


Fig. 2 - Evaluation of microparticle CD51 + / endothelium among Control Group, Group CEO and Group Endometrioma.

No correlation was found between age of the patients of any groups and the microparticles assay. In the Endometrioma group, the clinical parameters, maximum diameter of the lesion and time of the symptoms' onset did not correlate with any of the microparticles analyzed.

Table 2. Association between the maximum diameter of endometriomas and plasma levels of microparticles CD66+/neutrophils, CD45+/leukocyte, CD14+/monocytes, CD235+/erythrocytes, CD3+/lymphocytes, CD41+/platelets, CD51+/endothelium.

MP	< 4cm	> 4cm	p
CD66+/neutrophils	0,115 (0,071 – 1,73)	0,432 (0,27 – 1,61)	0,92
CD45+/leukocyte	1,53 (0,776 - 28,7)	6,54 (0,398 – 27,8)	0,69
CD14+/monocytes	0,217 (0,068 – 0,927)	0,445 (0,055 – 3,84)	0,69
CD235+/erythrocytes	0,1 (0,065 – 1,88)	0,544 (0,109 – 1,61)	0,62
CD3+/lymphocytes	0,458 (0,041 – 1,32)	0,366 (0,083 – 1,95)	0,92
CD41+/platelets	0,174 (0,078 – 16,3)	2,305 (0,109 – 4,57)	0,76
CD51+/endothelium	0,422 (0,152 – 2,24)	0,620 (0,16 – 3,22)	0,84

MP - microparticles. **cm** - centimeter. Data are expressed as median and interquartile ranges. Differences between groups were evaluated by Kruskal-Wallis test.

Table 3. Association between reported time between onset of symptoms and surgical treatment of endometriomas and plasma levels of microparticles CD66+/neutrophils, CD45+/leukocyte, CD14+/monocytes, CD235+/erythrocytes, CD3+/lymphocytes, CD41+/platelets, CD51+/endothelium.

MP	< 24 M	> 24 M	p
CD66+/neutrophils	0,157 (0,096 – 1,73)	0,505 (0,026 – 1,61)	0,84
CD45+/leukocyte	0,780 (0,771 – 19,6)	11,3 (0,751 – 28,7)	0,42
CD14+/monocytes	0,092 (0,068 – 0,927)	0,37 (0,055 – 3,67)	0,54
CD235+/erythrocytes	0,343 (0,069 – 1,61)	0,511 (0,098 – 2,1)	0,68
CD3+/lymphocytes	0,135 (0,049 – 1,95)	0,562 (0,027 – 1,32)	1,0
CD41+/platelets	0,885 (0,109 – 4,57)	1,87 (0,78 – 7,22)	0,76
CD51+/endothelium	0,387 (0,152 – 7,65)	0,621 (0,16 – 2,24)	0,91

MP - microparticles. **M** - Months. Data are expressed as median and interquartile ranges. Differences between groups were evaluated by Kruskal-Wallis test.

Discussion

The results of the study show a significant difference in the plasma concentration of MP CD51 + / endothelial between the Endometrioma Group and EOC Group, but were unable to demonstrate associations between other groups or other MPs.

According to our review of the literature, this is the first time that the analysis of microparticles in the evaluation of endometriosis and their interrelations with ovarian cancer is used. Our data point out to the potential of these particles as a tool to study these diseases.

MPs are stable structures and can be recovered in plasma and other body fluids which enhances their use as biomarkers.²⁰ They are involved in physiological and pathological aspects and maintains some molecular features that enable the identification of their original cells. More than cellular debris, microparticles plays an active role in multiple cellular processes, including intercellular communication, immunity, apoptosis and hemostasis. They are associated with vascular disease, cancer, diabetes mellitus and inflammatory response.²¹ MPs carry a pool of substances including, enzymes, growth factors, cytokines, chemokines, cell receptors, mRNA, miRNA and DNA. The mechanisms that determine the release of these structures by the cell and its composition are not clear yet, however, they are not only miniatures of the original cell.²²

The inflammatory response is associated with production of MPs and these appear to have an important role in modulating the cellular

microenvironment resulting in inflammation. They work in various aspects: some release cyclooxygenase type 2, platelet MPs act in the release of pro-inflammatory cytokines and leukocyte MPs seem to stimulate pro-angiogenic chemokines.⁷ Other inflammatory processes have shown an association with release of microparticles of leukocyte, erythrocyte and platelet.²³

Ovarian cancer and endometriosis are associated with the inflammatory response and with complex interrelationships of the immune system. For example, it was identified an increase in Tregs cells in association with advanced ovarian cancer and with the number and type of leukocyte infiltration, what can be used as important prognostic factor for the disease.²⁵ Studies have shown a correlation of ovarian cancer with cytokines and proinflammatory chemokines that would produce a complex network of mediators acting on tumor growth, angiogenesis and leukocyte infiltration, for example, TNF- α , IL-6, IL-8, CCL2, CXCL 12 e VEGF.¹² Endometriosis also demonstrated an association between cytokine, TNF- α , and T regs cells. These combined aspects make easier the growth of endometrial ectopic cells.²⁵

In this study, analysis of the MPs was not able to demonstrate a difference in cell activity for neutrophils, leukocytes, monocytes, erythrocytes, platelets or lymphocytes. However, previously, it was demonstrated that MPs platelet plays an important role in tumor progression. It has been shown that, both in solid and hematologic malignancies, MPs are rich in pro-angiogenic factors, and play an important role in tissue regeneration and metastases.^{26, 27}

Maybe the heterogeneity and the small size of our groups have interfered with our results.

The identification of a significant increase in CD51 + / endothelium in the endometrioma group points out to an important neoangiogenic activity, that has association with increased active endothelial cells and consequently increased production of MPs. Endothelial cells release MPs containing metalloproteinase (MMPs), associated with cell invasion, and contains vascular endothelial growth factor (VEGF) and sphingomyelin associated to angiogenesis.²⁹ We were unable to identify other studies that explored the association of endometriosis with MPs. The identification of specific characteristics and differences in cellular activity between the EOC group and Endometrioma group, stress the idea of distinct key points both in the pathophysiology and in aspects of inflammatory response for the diseases.

Further studies with larger numbers of patients are needed to define the role of MPs with cancer and ovarian endometriomas. Multicentric series may be necessary, especially given the low prevalence of ovarian cancer. Study groups with larger samples would provide greater patient stratification, an important aspect, since it has been demonstrated that the EOC includes diseases with different molecular, morphological and genetic characteristics, and may also have distinct cellular origin.,² More patients would allow an analysis of other aspects of endometriosis, such peritoneal endometriosis or deep endometriosis. Furthermore, it will be helpfull to analyse other body fluids, like ascites, which

has a large number of MPs and was associated with a greater preference to peritoneal dissemination of ovarian cancer.²⁹

Our data shows that there is a difference in the expression of CD51 MPs in patients with endometrioma and EOC. MPs have potential use in understanding the cellular micro-environments associated with this pathologies, since they can be recovered in plasma and other body fluids.

The improvement in the knowledge of these complex interrelationships between host and neoplasms, benign or malignant, can be key instruments in improving the diagnosis, differential diagnosis, prognostic evaluation, and even identifying therapeutic strategies for our patients.

References:

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society; 2013.
 2. Kurman RJ, Shih IeM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer – Proposed Inifying Theory. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar;34(3):433-43.
 3. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. (www.inca.gov.br/estimativa)
 4. Siufi Neto et al. Cellular Histologic, and Molecular Changes Associated with Endometriosis and Ovarian Cancer. *The Journal Of Minimally Invasive Gynecology. J Minim Invasive Gynecol.* 2014 Jan-Feb;21(1):55-63.
 5. Borghese B, Mondon F, Noël JC, et al. Gene expression. Profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol.* 2008;22:2557-2562.
 6. Muzzi L, Bianchi A, Bellati F, et al. Histologic analysis of endometriomas: what the surgeon needs to know. *Fertility and Sterility.* 2007;87(2):362-366.
 7. Wu ZH, Li H, Qiu GX, et al. Membrane microparticles and diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(18):2420-2427.
 8. Giusti I, D'Ascenzo S, Dolo V. Microvesicles as potential ovarian cancer biomarkers. *Biomed Res Int.* 2013;2013:703048.
-

9. D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 2012 Jun 15;26(12):1287-99. doi: 10.1101/gad.192351.112.
 10. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des* 2012; 18:1478-1493.
 11. Distler JH, Jungel A, Huber LC, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression. In synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2892-2897
 12. Musrap N, Diamandis EP. Revisiting the complexity of the ovarian cancer microenvironment – clinical implications for treatment strategies. *Mol Cancer Res*, 2012;10(10):1254-64.
 13. Worley Jr MJ, Welch WR, Berkowitz RS, Ng S. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: A Review of Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:5367-5379.
 14. Fidler IJ, Poste G. The “seed and soil” hypothesis revisited. *Lancet Oncol.* 2008;9:808.
 15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
-

16. Augoulea A, Alexandrou A, Crestsa M, et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;286:99-103.
 17. Pollacco J, Sacco K, Portelli M, et al. Molecular links between endometriosis and câncer. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(8):577-81.
 18. Bode AP, Hickerson DH. Characterization and quantitation by flow cytometry of membranous microparticles formed during activation of platelet suspensions with ionophore or thrombin. *Platelets.* 2000;11(5):259-71.
 19. Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, Grau GE, Riley EM, de Souza JB. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog.* 2010 Jan 29;6(1):e1000744.
 20. Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in câncer. *Curr Opin Oncolo,* 2013;25(1):66-75.
 21. Roos MA, Gennero L, Denysenko T, et al. Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem Funct* 2010;28:539-548.
 22. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercelular information Exchange. *Circulation Research* 2010;107(9):1047-1057.
-

23. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2010 Nov 16; 9:327.
 24. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cell in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942-949.
 25. Olovsson M. Immunological aspects of endometriosis: an update. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66:101-104.
 26. Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. *Thromb Res.* 2012;129(1):132-136.
 27. Varon D, Hayon Y, Dashevsky O, Shai E. Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration. *Thromb Res.* 2012; 130 (1):98-99.
 28. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 2010; 123(15):1603-1611.
 29. Press JZ, Reyes M, Pitteri SJ, et al. Microparticles from ovarian carcinomas are shed into ascites and promote cell migration. *Int J Gynecol Cancer.* 2012;22(4):546-552.
-

7. Considerações Finais

Observamos marcadores distintos com valores séricos, de líquido ascítico ou lavado peritoneal e nas amostras teciduais com diferenças significativas entre os grupos. Vários fatores podem estar ligados a estes achados, no entanto, ainda, não é possível definir os mecanismos biomoleculares envolvidos. no entanto, os resultados apresentados apontam para uma diferença de modulação do microambiente celular entre as duas patologias CEO e endometriomas. Entender as nuances destas diferenças podem ajudar a entender a fisiopatologia e as características que determinam a progressão destas doenças.

Mais estudos, com maior número de pacientes, serão necessários para definir o papel dos biomarcadores com o câncer de ovário e endometriomas. Series multicêntricas podem ser necessárias, devido à baixa prevalência do câncer de ovário e as diferentes formas de apresentação de ambas patologias.

O conhecimento das substâncias bioativas e mecanismos associados ao sistema imune e resposta inflamatória podem abrir a perspectiva de identificação de grupos de maior risco para o CEO ou desenvolvimento de formas mais graves de endometriose ou mesmo sua malignização. Pode ser possível identificar vias específicas que possam ser bloqueadas ou ativadas a fim de contribuir no controle e combate do CEO.

Talvez, o futuro esteja no entendimento dos diversos mecanismos envolvidos e nas diversas vias utilizadas pelo tumor em cada indivíduo, o que permitiria tratamento individualizado para cada paciente e cada neoplasia,

benigna ou maligna, baseada nas inter-relações que cada indivíduo estabelece com o tumor.

O aprimoramento no conhecimento destas complexas interrelações entre hospedeiro e neoplasias, malignas ou benignas, podem ser instrumentos fundamentais no aprimoramento do diagnóstico, diagnóstico diferencial, avaliação prognóstica e, até mesmo identificação estratégias terapêuticas.

Concluimos com os dados apresentados que existe uma diferença na expressão de citocinas, quimiocinas, e micropartículas em pacientes com endometrioma , CEO e controles, reforçando o papel destas substâncias como biomarcadores .



Anexas

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

Para: Dr. João Oscar de Almeida Falcão Junior

Prezado Dr. João Oscar,

Por meio desta, informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei analisou e APROVOU o protocolo de pesquisa intitulado: "*Análise comparativa da expressão de quimiocinas em pacientes com câncer de ovário*" em reunião ocorrida na data 30 de setembro de 2009, a ser conduzido na unidade de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Mater Dei, sob sua responsabilidade.

Cordialmente,


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

Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Mater Dei

II. Consentimento Livre e Esclarecido

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

IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE:

Nome: _____ Registro: _____
Idade: _____
Endereço: _____
Telefone: _____ Carteira de identidade: _____

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

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

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

1. DESCRIÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DOS MÉTODOS: não haverá aumento do risco de complicações devido à retirada do fragmento do útero ou ovário. As complicações serão as mesmas da cirurgia realizada para o tratamento de sua doença.

2. DESTINO DA PEÇA OPERATÓRIA: a peça cirúrgica será encaminhada à Anatomia Patológica para ser examinada.

3. Recebi todas as informações que desejava conhecer e a possibilidade de fazer perguntas e questionar dúvidas.

4. Também entendi que, a qualquer momento e sem necessidade de dar nenhuma explicação poderei suspender o consentimento que agora presto.

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

CEP/HOSPITAL MATER DEI: _____

De pleno acordo

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

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

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

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

III. Estadiamento do câncer epitelial do ovário (FIGO)

(Cancer of the ovary. In: Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. FIGO 2003, p93-118)

ESTÁDIO I: RESTRITO A OVÁRIOS

Ia Tumor restrito a um ovário

Ib Tumor restrito a ambos ovários

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

ESTÁDIO II: EXTENSÃO PARA ÓRGÃOS PÉLVICOS

Ila Tumor acomete trompas e/ou útero

Ilb Extensão a outros órgãos pélvicos

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

ESTÁDIO III: EXTENSÃO PARA ALÉM DA PELVE OU LINFONODOS

IIIa Metástase peritoneal microscópica além da pelve

IIIb Metástase peritoneal macroscópica de até 2cm além da pelve

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

ESTÁDIO IV: METÁSTASE A DISTÂNCIA ALÉM DA CAVIDADE PERITONEAL

IV. Classificação endometriose ASRM – 1996.

Classificação: (ASRM- 1996)

- Estadio I (mínima) – 1-5
- Estadio II (leve) – 6-15
- Estadio III (Moderda) – 16-40
- Estadio IV (Grave) - > 40

Peritônio	ENDOMETRIOSE	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm
	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
Ovário	Dir. Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
	Esq. Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
	OBLITERAÇÃO DE FUNDO DE SACO POSTERIOR	Parcial		Completa
		4		40
Ovário	ADERÊNCIAS	<1/3 encapsulado	1/3-2/3 encapsulado	>2/3 encapsulado
	Dir. Fina	1	2	4
	Densa	4	8	16
	Esq. Fina	1	2	4
	Densa	4	8	16
	Dir. Fina	1	2	4
Trompa	Densa	4*	8*	16
	Esq. Fina	1	2	4
	Densa	4*	8*	16

A determinação do estadiamento r-AFS é realizada através sistemas de escores pontuados esta classificação não utiliza, por exemplo, a necessidade de confirmação histológica para a doença.

A visualização da pelve deve ser realizada de forma sistemática e metódica no sentido horário ou anti-horário.

O número, tamanho e localização de implantes, placas, endometriomas e/ou aderências deve ser anotado.

Para avaliar a severidade dos implantes ou aderências deve-se levar em conta apenas o maior escore para peritônio, ovário, trompas e fundo de saco. Em pacientes com apenas um anexo, a pontuação encontrada em um anexo deve ser multiplicada por dois.

A pontuação encontrada em implantes e aderências deve ser totalizada a fim de indicar o estágio (mínima, leve, moderada ou severa). Escores entre 1 e 15 são compatíveis com endometriose mínima ou leve; escores entre 16 e 40, endometriose moderada; e acima de 40, endometriose severa. Endometriose intestinal, bexiga, vagina, etc devem ser anotadas como endometriose adicional. Doenças associadas também devem ser assinaladas (miomatose, malformações, etc).



Summary

Introduction: Epithelial ovarian cancer (EOC) and endometriosis have some similar aspects, such as tissue infiltration and ability to produce lesions in adjacent organs and at distance, however, differ markedly in its evolution. The analysis of the similarities and differences of the immune system and inflammatory response related to these conditions may allow a better understanding of its pathophysiology and thus contribute to the improvement of screening, diagnosis and therapeutic strategies. The objective of this study is to evaluate and compare the tissue gene expression, cytokines, chemokines, and microparticles, in plasma, ascites and peritoneal washings of patients with endometrioma and EOC. **Methods:** 60 patients were divided in 3 groups. EOC group, 26 patients, Endometriomas group, 18 patients and Control group, 16 patients. All patients had blood samples, ascites or peritoneal washings and tissue sampling of lesions. The material was stored for later analysis. Cytokines and chemokines were measured using the CBA, the tissue samples were evaluated using RT-qPCR and microparticles were evaluated with immunofluorescence technique modified for this analysis. We used the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test when appropriate. To identify associations between dosages in serum and scites or peritonela washings the Spearman correlation coefficient was used. A p value <0.05 was considered significant. **Results:** The mean age of patients in the groups EOC, endometrioma and control were respectively 62, 37 and 40.2 years. Patients were staged according to the FIGO criteria for ovarian cancer, 10 patients in stages I and II and 16 in stage III / IV. The staging of patients with endometriomas were performed according to the criteria of the ASRM identifying 15 patients in stage

III and 3 patients in stage IV. Serum levels of cytokines and chemokines had a higher concentration of IL-6 ($p = 0.0001$) and IL10 ($p = 0.0109$), CXCL8 ($p = 0.0463$) and CCL2 ($p = 0.026$) in EOC group compared to the control group. The IL-6 ($p = 0.0006$) CXCL99 ($p = 0.0009$) CXCL10 ($p = 0.0011$) markers showed a higher dosage of the EOC group relative to Endometrioma group. In contrast, in the analysis of ascites and peritoneal washing, IL8 ($p = 0.0061$), CCL2 ($p = 0.001$) and CXCL5 ($p = 0.001$) had higher concentrations in endometrioma group compared to the EOC group. The study of the molecular biology of the tissue showed higher gene expression of TGF ($p = 0.0283$) and CCL5 ($p = 0.0019$) in patients with endometrioma compared to the EOC group. For microparticles only CD51/endotélio showed higher concentration in the endometrioma group in relation to the EOC group. **Conclusions:** Our results demonstrate differences in the measurement of cytokines and chemokines, microparticles and tissue gene expression between the CEO and endometriomas. The recovery of these markers in the different study sites indicates a association of the inflammatory response, and stressed its value in the pathophysiology of both disease. It also, point out for the use of these markers as tools for evaluating the pathologies.

Keywords: Chemokines, Cytokines, Microparticles, Ovarian Cancer, Endometriomas, Inflammatory Response, CBA (Cytometric Bead Array), RT-qPCR (reverse transcription polymerase chain reaction).
