

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

ANA CAROLINNE DA SILVA

*ESTROMA E NEOPLASIAS OVARIANAS: PAPEL DA  
ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO E DA PROTEÍNA ALFA  
DE ATIVAÇÃO DOS FIBROBLASTOS*

UBERABA

2017

ANA CAROLINNE DA SILVA

**ESTROMA E NEOPLASIAS OVARIANAS: PAPEL DA  
ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO E DA PROTEÍNA ALFA  
DE ATIVAÇÃO DOS FIBROBLASTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosekeila Simões Nomelini

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

UBERABA  
2017

ANA CAROLINNE DA SILVA

**ESTROMA E NEOPLASIAS OVARIANAS: PAPEL DA ALFA-ACTINA DE  
MÚSCULO LISO E DA PROTEÍNA A DE ATIVAÇÃO DOS FIBROBLASTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Banca examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosekeila Simões Nomelini - Orientadora

Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Douglas Cobo Micheli

Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Paulo César Fernandes Júnior

Universidade Federal De Uberlândia/UFU

*Dedico aos meus avós que sempre foram minha referência e contribuíram na minha criação, formação e contribuem até hoje me apoiando em minhas escolhas.*

## AGRADEÇO

*Agradeço a Deus por todas as bênçãos e oportunidades derramadas.*

*Aos meus avós que são meu exemplo e referência que sempre abdicaram de muitas coisas para me proporcionarem o possível para que eu realizasse meus sonhos.*

*À minha mãe que sempre me ajudou com conselhos e orações.*

*À minha orientadora **Dra. Rosekeila Simões Nomelini**, que com sua generosidade e simplicidade depositou votos de confiança em mim e acreditou no meu trabalho, me proporcionando crescer a nível de conhecimento e como pessoa.*

*À minha supervisora aluna de pós-doutorado **Dra. Millena Prata Jammal**, que foi de extrema importância na realização desse projeto, me supervisionando com sua humildade inenarrável e dividindo seus conhecimentos comigo.*

*A **Dra. Renata Margarida Etchebehere** pelo apoio e colaboração no decorrer de todo o estudo.*

*Ao departamento de patologia cirúrgica onde realizou-se as técnicas.*

*A **Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**, onde realizou-se todo o projeto de pesquisa.*

*'Viva como se fosse morrer amanhã.  
Aprenda como se fosse viver para sempre''.*

*GANDHI*

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de ovário é um dos tipos de tumores ginecológicos que causam mais óbitos em todo mundo, apresentando uma pequena taxa de sobrevivência global. É uma doença insidiosa e é comumente diagnosticada em estádios mais avançados, podendo apresentar rápida evolução. Estudos demonstram que o crescimento tumoral não é determinado apenas pelas células malignas, já que as interações entre as células cancerosas e o compartimento estromal têm impactos importantes no crescimento e progressão do câncer. Os tipos celulares de extrema importância no estroma tumoral são os fibroblastos associados ao câncer, e de acordo com estudos retrospectivos, eles têm um papel funcional importante em relação às células nos processos de metástase e progressão devido à interação célula-a-célula e fatores solúveis, responsáveis pela secreção de citocinas, componentes da matriz extracelular e quimiocinas.

**Objetivos:** Investigar a expressão imunohistoquímica de dois marcadores de fibroblastos associados ao câncer, a  $\alpha$  - actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e a proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos (FAP) no compartimento estromal de neoplasias benignas e malignas epiteliais de ovário, e relacionar a expressão destas no compartimento estromal com fatores prognósticos no carcinoma epitelial de ovário.

**Materiais e Métodos:** Foram avaliadas prospectivamente 56 pacientes que se submeteram a tratamento cirúrgico por cisto ovariano e com diagnóstico confirmado de neoplasia ovariana.

Foi realizado o estudo imunohistoquímico para  $\alpha$  - actina de músculo liso e a proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos. Os fatores prognósticos foram avaliados usando o Teste Exato de Fisher. O nível de significância foi inferior a 0,05.

**Resultados:** Das 56 pacientes avaliadas, 28 tinham neoplasias malignas de ovário e 28 neoplasias benignas. A marcação imunohistoquímica da proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos foi mais expressiva nas neoplasias malignas quando comparado com as benignas (0,0366). Em relação à imunomarcação de  $\alpha$ -actina de músculo liso, não houve significância estatística. Na avaliação imunohistoquímica da proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos, os graus histológicos 2 e 3 foram significativamente relacionados com imunohistoquímica de marcação 2/3 ( $p = 0,0183$ ). Não houve diferença significativa em relação aos outros fatores prognósticos estudados.

**Conclusão:** A imunomarcação de FAP é mais intensa em neoplasias malignas que em neoplasias benignas de ovário, e também em neoplasias malignas moderadamente diferenciadas e indiferenciadas comparada com neoplasias bem diferenciadas, sugerindo ser marcador de pior prognóstico. Assim, a FAP, no futuro, pode ser um caminho para novas terapias-alvo no câncer de ovário.

**Palavras-chave:** neoplasias ovarianas, fibroblastos associados ao câncer, estroma,  $\alpha$ -actina de músculo liso, proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos, imunohistoquímica, fatores prognósticos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Ovarian cancer is one of the types of gynecological tumors that cause more deaths worldwide, presenting a small overall survival rate. It is an insidious disease and it is commonly diagnosed in more advanced stages, and may present a rapid evolution. Studies show that tumor growth is not only determined by malignant cells, since the interactions between cancer cells and the stromal compartment have important impacts on the growth and progression of cancer. The most important cell types in the tumor stroma are the fibroblasts associated with cancer. According to retrospective studies, they play an important functional role in relation to cells in the processes of metastasis and progression due to cell-to-cell interaction and soluble factors, responsible for the secretion of cytokines, extracellular matrix components and chemokines.

**Objectives:** The aims of the study were to investigate two cancer-associated fibroblasts markers, alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and fibroblast activation protein alpha (FAP), in the stromal compartment of benign and malignant ovarian epithelial neoplasms, and to relate their tissue expression with prognostic factors in ovarian cancer.

**Materials and Methods:** We prospectively evaluated 56 patients who underwent surgical treatment for ovarian cyst and with a confirmed diagnosis of ovarian neoplasia. The

immunohistochemical study was performed for  $\alpha$ -SMA e FAP. The prognostic factors were evaluated using Fisher's Exact Test. The level of significance was less than 0.05.

**Results:** Fifty-six patients were evaluated, 28 had malignant ovarian neoplasms and 28 benign neoplasms. FAP immunostaining was stronger in ovarian cancer when compared to benign neoplasms (0.0366). In ovarian cancer, FAP stainings 2/3 was significantly related to histological grades 2 and 3 ( $p = 0.0183$ ). There was no significant difference in relation to the other prognostic factors studied.

**Conclusion:** FAP immunostaining is more intense in malignant neoplasms than in benign ovarian neoplasms, as well as in moderately differentiated and undifferentiated ovarian carcinomas compared to well differentiated neoplasms, suggesting to be a marker of worse prognosis.

**Key-words:** ovarian neoplasms, cancer-associated fibroblasts, alpha-smooth muscle actin, fibroblast activation protein alpha, immunohistochemistry, prognostic factors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Diferenças na marcação imunohistoquímica da Proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos (FAP) em neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário.

**Figura 2.** Marcações imunohistoquímicas. Cortes histológicos de neoplasia ovariana. A: fraca marcação estromal de A-actina de músculo liso em neoplasia maligna de ovário (400x); B: forte marcação estromal de A-actina de músculo liso em neoplasia maligna de ovário (100x); C: fraca marcação estromal de FAP em neoplasia benigna de ovário (200x); D: forte marcação estromal de FAP em neoplasia benigna de ovário (400x).

**Figura 3:** Distribuição da Proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos de acordo com o grau histológico, sendo imunomarcação leve (0 e 1), e imunomarcação forte (2 e 3).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características gerais dos grupos de pacientes com Neoplasia Ovariana, atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG (Média±DP).....	32
<b>Tabela 2.</b> Distribuição das neoplasias benignas de ovário (n=28) segundo o diagnóstico histopatológico. ....	33
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das neoplasias malignas de ovário (n=28) segundo o diagnóstico histopatológico. ....	34
<b>Tabela 4:</b> Distribuição das neoplasias malignas de ovário conforme o estadiamento FIGO, das pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG.....	35
<b>Tabela 5.</b> Marcação imunohistoquímica da Proteína $\alpha$ de ativação dos fibroblastos (FAP) em neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário.....	36
<b>Tabela 6.</b> Marcação imunohistoquímica da alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA) em neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário.....	37

**Tabela 7:** Distribuição dos fibroblastos associados ao câncer com imunomarcção estromal 2/3, de acordo com o grau histológico, estadiamento, metástases em linfonodos, resposta a quimioterapia e sobrevida livre da doença.....38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>UFTM</b>	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
<b>HC-UFTM</b>	Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
<b>IPON</b>	Instituto de Pesquisa em Oncologia
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CAFs</b>	Fibroblastos Associados ao Câncer
<b>CD</b>	Células Dendríticas
<b>TAMS</b>	Macrófagos associados ao tumor
<b>TN-C</b>	Tenascina C
<b>TSP-1</b>	Trombospondina-1
<b>SL-1</b>	Estromelisina-1
<b>SL-1</b>	Estromelisina-1
<b>FSP</b>	Proteína fibroblástica específica

<b>DAB</b>	diaminobenzidine
<b>PBS</b>	tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
<b>MHC</b>	histocompatibilidade
<b>P</b>	probabilidade
<b>N</b>	número de casos
<b>IL</b>	interleucina
<b>TNF- A</b>	fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>MMPS</b>	metaloproteinase de matriz
<b>MMP-12</b>	metaloelastase
<b>ECS</b>	células endoteliais

---

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Câncer Epitelial de ovário.....	18
1.2 Modelo Adnex.....	20
1.3 Estroma.....	22
1.3.1 Estroma e crescimento tumoral.....	22
1.4 Aspectos imunológicos e constituintes celulares.....	24
1.4.1 Pericitos.....	24
1.4.2 Células endoteliais.....	25
1.4.3 Fibroblastos associados ao câncer (CAFs).....	26
1.4.3.1 Proteína de Ativação dos fibroblastos (FAP).....	28
1.4.3.2 A actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).....	30
1.5 Estroma no câncer de ovário.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
4 HIPÓTESES.....	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
6 RESULTADOS.....	42
7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÃO.....	55
9 REFERÊNCIAS.....	56
10 ANEXOS.....	70

# 1. INTRODUÇÃO

1

## 2 1.1 Câncer Epitelial de Ovário

3

4 O câncer de ovário é um dos tipos de tumores ginecológicos que causam mais óbitos  
5 em todo mundo, apresentando uma pequena taxa de sobrevivência global (CORVIGNO et al.,  
6 2016). É uma doença insidiosa e é comumente diagnosticada em estádios mais  
7 avançados, podendo apresentar rápida evolução. A maioria dos tumores de ovário são  
8 carcinomas epiteliais, e atualmente cinco subtipos principais foram identificados: tumores  
9 ovarianos serosos de alto grau, seroso de baixo grau, mucinoso, endometrióide e tumores  
10 ovarianos de células claras (YANG et al., 2016). Em relação ao câncer epitelial de ovário de  
11 alto grau, além de ser uma malignidade ginecológica que apresenta altos índices de  
12 mortalidade, apresenta também uma grande heterogeneidade (YANG et al., 2016).

13 Estudos têm proposto um modelo de carcinogênese ovariana que leva em conta a  
14 natureza do câncer de ovário correlacionada aos aspectos clínicos, patológicos e moleculares  
15 da doença. Neste modelo, os tumores do ovário são divididos em 2 grupos, tipo I e tipo II,  
16 conforme suas características patológicas, genéticas e moleculares (KURMAN & SHIH,  
17 2010; ALI-FEHMI et al., 2011; KURMAN & SHIH, 2011).

18 Os tumores ovarianos do tipo I são caracterizados por crescimento lento, podem se  
19 desenvolver a partir de lesões precursoras, e apresentam linhagem entre tumores benignos e  
20 limítrofes (*borderline*). Já os tumores ovarianos do tipo II crescem rapidamente e são  
21 altamente agressivos, manifestam características papilares sólidas e glandulares. Exemplos  
22 desses tumores são carcinomas serosos de alto grau, tumores mesodérmicos malignos mistos  
23 (carcinossarcomas) e indiferenciados (KURMAN & SHIH, 2010).

1 De um modo geral, tumores ovarianos serosos de baixo e alto graus são neoplasias que  
2 abrangem 70% dos tumores de ovário e acarretam a maioria dos óbitos. Essas neoplasias  
3 ovarianas representam um grupo distinto com peculiaridades de carcinogênese, e atualmente  
4 exibem diferentes alterações genéticas, comportamentos clínicos e padrões moleculares. Os  
5 tumores ovarianos serosos de baixo grau se comportam de forma indolente e apresentam  
6 classificação provenientes de mutações específicas, e são geneticamente estáveis (TERADA  
7 et al., 2016). Já os tumores ovarianos de alto grau são caracterizados por apresentarem  
8 padrões mais agressivos, diagnósticos tardios e alta instabilidade genética. Grande parte  
9 desses tumores apresentam mutações na P53, mas dificilmente abrigam as mutações  
10 descobertas nos tumores serosos de baixo grau (CIUCCI et al., 2016).

11 Em relação ao processo de patogênese das neoplasias ovarianas, nenhuma teoria foi  
12 definitivamente estabelecida. Uma delas sugere o surgimento de neoplasias ovarianas a partir  
13 de cistos de inclusão cortical e que posteriormente se desenvolvem através do epitélio de  
14 superfície dos ovários. Contudo, mediante a heterogeneidade da doença e dos tumores,  
15 diferenças nas características comportamentais, clínicas e patológicas, a elucidação da  
16 carcinogênese ainda é um processo em estudo (KURMAN, 2013).

17 Esquemas de classificação emergentes baseados em perfis moleculares estão sendo  
18 abordados para facilitar a compreensão da heterogeneidade do câncer epitelial de ovário e do  
19 desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas, onde se torna imprescindível o  
20 estudo do microambiente tumoral em termos de estroma em pacientes com câncer epitelial de  
21 ovário (YANG et al., 2016).

22

23 1.2 Modelo Adnex

24

1 A caracterização e investigação pré-operatória de massas anexiais possuem uma  
2 importância significativa na elaboração de estratégias em relação às neoplasias ovarianas.  
3 Inicialmente, é necessário fazer a diferenciação entre tumores benignos e malignos, o que é  
4 vantajoso para a conduta de pacientes com neoplasias ovarianas, sendo aquelas com critérios  
5 sugestivos de malignidade encaminhadas aos centros oncológicos de ginecologia para cirurgia  
6 e tratamento adjuvante (EARLE et al., 2006; WOO et al., 2012). Neoplasias ovarianas  
7 benignas podem ser acompanhadas e conduzidas através de cirurgia conservadora para  
8 preservar a fertilidade, e consequentemente reduzindo a morbidade (VAN CALSTER et al.,  
9 2015). Além disso, a proposta de tratamento para massas anexiais é dependente do tipo do  
10 tumor. Tumores *borderline* (BOT) podem ser tratados com procedimentos menos agressivos  
11 em relação aos tumores malignos, para preservação da fertilidade, porque a maioria desses  
12 tumores acontece em mulheres jovens, onde a preocupação principal é a fertilidade (TINELLI  
13 et al., 2006; DARAI et al., 2013). Contudo, neoplasias ovarianas que apresentam  
14 estadiamento I também podem ser tratadas de forma mais conservadora do que em  
15 estadiamentos II-IV (VAN CALSTER et al., 2015). Recentemente, a Análise Internacional de  
16 Tumores Ovarianos (IOTA), grupo que elaborou a proposta de avaliação das diferenças  
17 neoplásicas no modelo (ADNEX), é caracterizado por ser o primeiro modelo de diferenciação  
18 tumoral, classificando os tumores em: benignos, *borderline*, estadiamento I invasivo,  
19 estadiamento II-IV invasivos e metastático (VAN CALSTER et al., 2011; VAN CALSTER et  
20 al., 2015).

21 Em relação à população abordada no estudo, o modelo ADNEX foi desenvolvido e  
22 validado, mediante a utilização de dados de fases de 1-3 do IOTA de pacientes coletadas de  
23 uma forma prospectiva, as quais foram encaminhadas para a realização de exames de  
24 ultrassonografia em um dos centros relacionados ao estudo ou a uma massa anexial de caráter

1 suspeito (TIMMERMAN et al., 2005; VAN HOLSBEKE et al., 2009; KAIJSER et al., 2014).  
2 As pacientes elegíveis para inclusão deveriam apresentar pelo menos uma massa anexial,  
3 onde a mesma não foi considerada como massa ou cisto fisiológico ou funcional, e passaram  
4 por avaliações clínicas, tendo indicação para procedimentos cirúrgicos. Em contrapartida, os  
5 critérios de exclusão foram a recusa na realização da ultrassonografia transvaginal, gestação  
6 no momento da investigação e realização de procedimentos cirúrgicos em mais de 120 dias  
7 seguidos da realização do exame de ultrassonografia (TIMMERMAN et al., 2005). Caso a  
8 paciente apresente múltiplas massas, a massa com indicação de complexidade em sua  
9 morfologia foi selecionada para análise. Quando havia mais de uma massa indicando  
10 morfologia similar, foi utilizada a massa mais acessível e de tamanho maior (VAN CALSTER  
11 et al., 2014).

12 O modelo ADNEX consiste em três preditores clínicos e seis preditores  
13 ultrassonográficos. Os preditores clínicos consistem em CA-125 sérico (U/ml), idade e o  
14 centro para onde a paciente foi encaminhada para a realização de ultrassonografia. Os centros  
15 foram divididos em centros oncológicos de ginecologia e outros hospitais. Os preditores de  
16 ultrassonografia são caracterizados mediante avaliação do diâmetro máximo da lesão (cm),  
17 proporção sólida do tecido (%), número de projeções papilares (0,1,2,3 >3), presença de mais  
18 de 10 cistos loculares (sim/não), sombras acústicas (sim/não) e presença de ascite (sim/não)  
19 (VAN CALSTER et al., 2015).

20

### 21 1.3 Estroma

22

23 Os tumores sólidos malignos não são apenas células neoplásicas autônomas, são  
24 formados por células malignas e estroma que se influenciam mutuamente. O estroma tumoral

1 consiste em células não-malignas do tumor, como fibroblastos associados ao câncer, células  
2 mesenquimais, células imunes inatas e adaptativas, vasculatura com células endoteliais e  
3 pericitos, além de matriz extracelular constituída por proteínas estruturais (colágeno e  
4 elastina), proteínas especializadas (fibrilina, fibronectina e elastina) e proteoglicanos. Dentre  
5 as células imunes, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) chegam a representar metade  
6 da massa tumoral (SICA et al., 2002). Estes diferentes tipos de células no ambiente estromal  
7 podem ser recrutados por células malignas para favorecer o crescimento tumoral e facilitar a  
8 metástase (BREMNES et al., 2011).

9

### 10 1.3.1 Estroma e crescimento tumoral

11

12 Estudos demonstram que o crescimento tumoral não é determinado apenas pelas  
13 células malignas, já que as interações entre as células cancerosas e o compartimento estromal  
14 têm impactos importantes no crescimento e progressão do câncer. As células tumorais podem  
15 residir no estroma e transformá-lo, alterar o tecido conjuntivo circundante, e modificar o  
16 metabolismo das células residentes, produzindo assim um estroma permissivo (ZIGRINO et  
17 al., 2005; BREMNES et al., 2011).

18

19 Com o crescimento do tumor sólido, a difusão do oxigênio e nutrientes aos tecidos  
20 torna-se insuficiente e há aparecimento de múltiplas áreas de hipóxia. Há atração de  
21 monócitos diferenciados em TAMs e, em seguida, acumulam-se nas regiões hipóxicas onde  
22 produzem os fatores de transcrição induzíveis pela hipóxia HIF-1 e HIF-2, que ativam um  
23 vasto conjunto de genes de promoção de células tumorais, invasão e angiogênese (LEE et al.,  
2006).

1 A angiogênese é a principal via de estabelecimento da metástase e desenvolvimento  
2 tumoral, já que este último requer uma grande demanda de oxigênio e nutrientes, e isto se  
3 torna viável pela formação de novos vasos e aumento da permeabilidade vascular  
4 (BISACCHI et al., 2003). A vasculatura dos tumores é tortuosa, possui regiões dilatadas e  
5 ausência da camada de pericitos, tornando-os mais permeáveis que o tecido não tumoral  
6 (CAIRNS et al., 2006).

7 Dentre os fatores pré-angiogênicos produzidos por células no estroma tumoral,  
8 destacam-se o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator básico de  
9 Crescimento de Fibroblastos (bFGF), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de  
10 Transformação do Crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas  
11 (PDGF), citocinas como IL-8 (CXCL-8), IL-6 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além de  
12 enzimas líticas como as metaloproteases de matriz (BISACCHI et al., 2003; MANTOVANI  
13 et al., 2004).

14 A indução da metaloproteinase de matriz (MMPs) consiste em enzimas extracelulares  
15 proteolíticas que conduzem à degradação da membrana basal e a invasão do estroma por  
16 células endoteliais que proliferam, migram e se tornam uma estrutura capilar (PAZOS &  
17 NADER, 2007; BREMNES et al., 2011).

18 Os macrófagos são capazes de produzir algumas metaloproteinases de matriz que  
19 podem ser tanto moléculas pró-angiogênicas quanto anti-angiogênicas (BINGLE et al., 2002).  
20 Em especial, a metaloelastase (MMP-12) produzida por TAMs gera angiostatina, uma  
21 molécula anti-angiogênica resultante da clivagem proteolítica do plasminogênio por  
22 proteases, que é principalmente produzida por TAMs (DONG et al., 1997). Assim, vários  
23 estudos em tumores humanos o acúmulo de TAMs tem sido associado a angiogênese (SICA  
24 et al., 2006).

1

2

#### 1.4 Aspectos imunológicos e constituintes celulares

3

4

As células tumorais são imprescindíveis para a iniciação e progressão neoplásica, mas são incapazes de fazê-las isoladamente. Várias células não tumorais (macrófagos, fibroblastos, células endoteliais) são recrutadas de sítios circunjacentes e/ou distantes para constituir o estroma do microambiente tumoral. Juntamente com a matriz extracelular, essas células recrutadas são capazes de promover o câncer, através do escape da vigilância imunológica, ativação da angiogênese, invasão e metástase, e dar suporte à resistência terapêutica (WINSLOW et al., 2016).

11

12

##### 1.4.1 Pericitos

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Os pericitos são células murais vasculares embutidas na membrana basal de microvasos sanguíneos (SWEENEY et al., 2016), e foram descobertos e descritos em 1873 por Charles-Marie Benjamin Rouget, a princípio nomeados por células de Rouget. Após alguns anos, essas células foram renomeadas por Karl Wilhelm Zimmermann em 1923 devido sua localidade anatômica, envolvendo capilares e vênulas pós-capilares. Ilustrando a localização anatômica dos pericitos, os mesmos são nomeados pericitos aluminais em relação as células endoteliais, e nomeados pericitos luminais para as células do parênquima (DORR-DUFFY & CLEARY, 2011; NAVARRO et al., 2016).

22

23

24

São células responsáveis pela regulação local de extrema importância para manter os processos de hemostasia e homeostase, e são uma fonte potente de células pluripotentes em estágio maduro. Possuem funcionalidade conhecida nos processos de homeostase vascular e

1 nos processos de angiogênese, o que contribui na orientação das células endoteliais na  
2 maturação e em processos de estabilidade vascular (DORE-DUFFY & CLEARY, 2011;  
3 NAVARRO et al., 2016).

4 O processo de angiogênese é crucial para todos os episódios de desenvolvimento  
5 normal e até processos patológicos, onde incluem eventos de metástase e crescimento tumoral  
6 (OZERDEM & STALLCUP , 2003), e seu início é caracterizado devido ao deslocamento dos  
7 pericitos e células endoteliais, e da degradação da membrana basal, conseqüentemente  
8 ocorrendo a migração e multiplicação das células endoteliais, o que irá contribuir para  
9 montagem de estruturas tubulares de células endoteliais, o que contribuirá para a estabilidade  
10 de vasos por pericitos inicialmente recrutados (JAIN, 2003; DORE-DUFFY & CLEARY,  
11 2011).

12

#### 13 1.4.2 Células endoteliais

14

15 Situadas na interface entre os tecidos e o fluxo sanguíneo, as células endoteliais (ECs)  
16 são responsáveis pelo alinhamento da vasculatura e são caracterizadas como células-chaves  
17 participantes na regulação da pressão arterial, inflamação, coagulação, atividade leucocitária e  
18 homeostase vascular. As células endoteliais também expressam complexos MHC de classe I e  
19 de classe II, os quais contribuem na ativação de respostas imunes (ROUGER et al., 2016).

20 Para manifestar uma resposta à inflamação, as células endoteliais são ativadas e assim  
21 propiciam a inflamação devido a eventos de expressão de moléculas de adesão para leucócitos  
22 ativos e liberação de quimiocinas e citocinas. Este processo de ativação das células endoteliais  
23 pode ser reversível e transitório ou sustentado no decorrer do processo de inflamação aguda  
24 que manifesta a desordem funcional das células endoteliais (ROUGER et al., 2016).

1 Durante o processo de crescimento progressivo tumoral, as células endoteliais  
2 adquirem novas características e secretam citocinas que estimulam a neovascularização de  
3 forma autócrina e endócrina. Além disso, células endoteliais progenitoras derivadas da  
4 medula óssea contribuem para o crescimento tumoral, fornecendo células endoteliais que  
5 diretamente se incorporam ao endotélio vascular do tumor (HAMMERLING & GANSS,  
6 2006).

7

#### 8 1.4.3 Fibroblastos Associados ao Câncer (CAFs)

9

10 Os tipos celulares de extrema importância no estroma tumoral são os fibroblastos  
11 associados ao câncer e, de acordo com estudos retrospectivos, eles têm um papel funcional  
12 importante em relação às células nos processos de metástase e progressão devido a interação  
13 célula-a-célula e fatores solúveis, responsáveis pela secreção de citocinas, componentes da  
14 matriz extracelular e quimiocinas (CIUCCI et al., 2016).

15 Os fibroblastos normais estão em estado de repouso inativo, incorporados dentro da  
16 matriz extracelular, e se ativam na cicatrização de feridas (KALLURI & ZEISBERG, 2006).  
17 Nessa ativação, estas células são capazes de produzir mediadores tais como fatores de  
18 crescimento, citocinas, quimiocinas e outros moduladores imunes. No entanto, assim que a  
19 cicatrização da ferida é completada, a maior parte destes fibroblastos ativados são removidos  
20 do tecido de granulação por apoptose. A fibrose tecidual pode ser considerada como uma  
21 ferida em constante processo de cicatrização, exibindo ativação de reparo contínuo. Isto é  
22 controlado, em parte, por mecanismos epigenéticos nos fibroblastos ativados, aumentando as  
23 vias anti-apoptóticas, e iniciando a proliferação para gerar fibroblastos hiperativados. O  
24 remodelamento patológico e a fibrose em diferentes tecidos podem engajar a ativação de

1 fibroblastos associados a fibrose (FAFs) com origens, marcadores de ativação e funções  
2 distintas (DRISKELL et al., 2013; HAMBURG-SHIELDS et al., 2015; KALLURI, 2016).

3 O reparo tecidual crônico também ocorre no cenário das lesões do parênquima  
4 funcional encontrado no câncer. Nesse sentido, os tumores são considerados "feridas que não  
5 cicatrizam" (DVORAK, 1986). O acúmulo de células cancerosas num determinado tecido  
6 representa uma lesão tecidual contínua, iniciando uma resposta crônica de cicatrização de  
7 feridas em relação às células cancerosas. Isto resulta em uma fibrose do câncer ou estroma  
8 tumoral (KALLURI, 2016).

9 No caso de fibroblastos associados ao câncer, os fibroblastos ativados não são  
10 removidos pela apoptose como na cicatrização normal, sendo assim, contribuintes na  
11 carcinogênese (SILZLE, 2004). Tais fibroblastos ativados possuem também envolvimento na  
12 produção de um nicho específico para células cancerígenas, que promove a motilidade das  
13 mesmas. Além disso, demonstram similaridade com miofibroblastos e expressam diversos  
14 marcadores classificados como marcadores mesenquimais, tais como: proteína  $\alpha$  de ativação  
15 dos fibroblastos (FAP), vimentina e a  $\alpha$ -actina do músculo liso (GIANNONI et al., 2010).  
16 Possuem também variedade em relação a nomenclaturas as quais podem ser: fibroblastos  
17 associados ao câncer (CAFs), fibroblastos associados ao tumor, fibroblastos ativos ou  
18 miofibroblastos ativados e incluem também câncer-associado a células tronco mesenquimais  
19 (KALLURI, 2016).

20 Em resposta ao crescimento tumoral, os fibroblastos são ativados principalmente por  
21 TGF- $\beta$  , quimiocinas e agentes de degradação da matriz extracelular, tais como as MMPs  
22 (MUELLER & FUSENIG, 2004). TGF- $\beta$  é supressor da tumorigênese (GALLIHER et al.,  
23 2006).

1 Pesquisas indicam que CAFs que produzem quimiocinas em níveis superiores  
2 provocam o início e a progressão das neoplasias ovarianas (LEUNG et al., 2014) e suas  
3 expressões estão relacionadas a mau prognóstico (BUSUTTIL et al., 2014) e  
4 quimiorresistência no câncer epitelial de ovário (RYNER et al., 2015).

5 Os CAFs podem ser reconhecidos pela sua expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, mas  
6 devido à heterogeneidade de sua expressão, esta sozinha não representa todos os CAFs.  
7 Assim, outros marcadores de CAFs utilizados são a proteína 1 fibroblasto específica, a  
8 proteína de ativação de fibroblastos (FAP) e Receptor de fator de crescimento derivado de  
9 plaquetas (PDGF) (KALLURI & ZEISBERG, 2006).

10 PDGF é um fator quimiotático e de crescimento para as células mesenquimais e  
11 endoteliais, regulador de fibroblastos e pericitos e desempenha papéis importantes na  
12 progressão tumoral (ANDRAE et al., 2008). Tem função autócrina na replicação de células  
13 tumorais, mas também é um agente potencial de função parácrina no desenvolvimento de  
14 estroma tumoral. Induz a proliferação de fibroblastos ativados e possivelmente recruta CAFs  
15 indiretamente por estimulação de TGF- $\beta$  (BREMNES et al., 2011).

16

#### 17 1.4.3.1 Proteína A de Ativação dos Fibroblastos (FAP)

18

19 A FAP foi especialmente identificada em um grupo de fibroblastos ativados, onde a  
20 mesma corresponde a uma glicoproteína transmembranosa de superfície celular ligada ao tipo  
21 II serina protease a qual pertence a subfamília dipeptidil peptidase (DPP), responsável por  
22 clivar a ligação entre a prolina e outros aminoácidos comuns. Ela é expressa em processos de  
23 modelamento tecidual, tais como na granulação e cicatrização, em células estaminais  
24 mesenquimais provenientes da medula óssea e também em processos de ativação estromal de

1 fibroblastos (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015). Isso deve-se mediante armazenamento  
2 das células mesenquimais estromais na medula óssea, que são liberadas por estímulos  
3 circulatórios para manter a harmonia dos tecidos conectores.

4 Possui também característica antigênica associada ao tumor, onde envolve a matriz  
5 extracelular, propiciando um remodelamento e uma elevada expressão de fibroblastos  
6 estromais reativos em mais de 90% das neoplasias epiteliais (BAE et al., 2008), promovendo  
7 eventos de crescimento tumoral, pró-angiogênicos e características miofibroblásticas  
8 (SPAETH et al., 2009).

9 Diversos estudos demonstram vias de sinalização autônomas, classificadas como não-  
10 celulares mediante promoção de eventos carcinogênicos de origem epitelial promovidos pela  
11 FAP. Com isso, é possível afirmar que a FAP manifesta efeitos pleiotrópicos durante o  
12 processo de desenvolvimento tumoral e conseqüentemente processos de disseminação  
13 (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015).

14 A caracterização da FAP é feita baseada em quatro componentes de classificação  
15 estabelecidos como: (1) genes associados ao aumento da agressão tumoral, como Tenascina C  
16 (TN-C), Trombospondina-1 (TSP-1), e Estromelisina-1 (SL-1); (2) potencial de  
17 vascularização dos miofibroblastos, onde inclui a  $\alpha$ -actina de músculo liso, fator de  
18 crescimento vascular endotelial (VEGF) e desmina; (3) fatores de crescimento como TGF-  
19 beta, HGF, fator de dispersão (SF), fator de crescimento fibroblástico básico (BFGF) e fator  
20 de crescimento epidérmico; e (4), marcadores de fibroblastos, como proteína fibroblástica  
21 específica (FSP) e proteína de ativação dos fibroblastos (FAP) (SPAETH et al., 2009).

22 É evidente que a expressão de FAP pelo estroma tumoral possui um papel  
23 significativo e vem demonstrando grande importância nos processos de formação tumoral e  
24 conseqüentemente crescimento e metástase (SPAETH et al., 2009; MHAWECH-

1 FAUCEGLIA et al., 2015). Porém, ela também está presente em um subconjunto de células  
2 imunes CD45+, portanto a sua origem e morfologia devem ser levados em consideração ao  
3 ser identificada ou não como fibroblasto ativado (ARNOLD et al., 2014).

4

#### 5 1.4.3.2 Alfa - actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)

6

7 A expressão de  $\alpha$ -SMA correlaciona-se com a ativação de miofibroblastos, que são  
8 uma forma de célula fibroblástica que se diferenciou parcialmente para um fenótipo de  
9 músculo liso. A diferenciação entre fibroblastos e miofibroblastos representa um evento chave  
10 durante a cicatrização e reparação tecidual. A elevada força contrátil gerada pelos  
11 miofibroblastos é benéfica para a remodelação fisiológica do tecido, mas prejudicial para a  
12 função dos tecidos quando se torna excessiva, como na reação do estroma aos tumores  
13 (CHERNG et al., 2008; NAKATANI et al., 2008).

14 Os principais filamentos que compõem a célula miofibroblástica contém actina e/ou  
15 desmina, principalmente a isoforma  $\alpha$ -actina de músculo liso, localizada nas células  
16 musculares lisas da parede dos vasos sanguíneos (DARBY et al., 1990).

17 A actina é uma proteína estrutural globular que forma o citoesqueleto, dando suporte  
18 mecânico para a célula, determinando sua forma e permitindo seu movimento (LAMBERT;  
19 PERRI; MEEHAN, 2005; CHERNG et al., 2008).

20 A  $\alpha$ -SMA é a isoforma da actina que predomina dentro das células musculares lisas  
21 vasculares e desempenha um papel contrátil importante na fibrogênese (CHERNG et al.,  
22 2008; KAWASAKI et al., 2008). Também está presente nos fibroblastos. A diferenciação de  
23 fibroblastos em miofibroblastos se dá pela ação de citocinas e fatores de crescimento, como o  
24 TGF (CHAPONNIER & GABBIANI, 2004).

1 Estudos vêm demonstrando a presença de  $\alpha$ -SMA como um fibroblasto associado ao  
2 câncer no estroma de tumores (SUGIMOTO et al., 2006; ANDERBERG et al., 2009;  
3 PIETRAS & OSTMAN, 2010). Desde 1989, Czernobilsky et al. encontraram a expressão de  
4  $\alpha$ -SMA em tecidos de tumor ovariano, mais precisamente nas paredes dos vasos sanguíneos,  
5 fibras musculares e células do estroma. Okamoto-Inoue et al. (1990) relacionaram a expressão  
6 de  $\alpha$ -SMA com a progressão de células malignas ovarianas (KOBAYASHI et al., 1993).

7 Pesquisas continuam relacionando a  $\alpha$ -SMA como membro importante na iniciação,  
8 progressão e metástase de células do câncer de ovário (OSTMAN & AUGSTEN, 2009;  
9 ZHANG et al., 2011). No trabalho de Zhang et al. (2011) que analisou a expressão  
10 imunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA em amostras de tecido saudável de ovário, de tumor benigno e  
11 de tumor maligno, os resultados demonstraram uma forte marcação localizada no citoplasma  
12 de fibroblastos do estroma e pericitos vasculares, em tumores benignos e, principalmente, nos  
13 tumores malignos. No tecido ovariano normal, a expressão de  $\alpha$  - SMA foi detectada apenas  
14 em pericitos vasculares, mas não nos fibroblastos estromais (ZHANG et al., 2011).

15 Outro estudo relatou que o ácido lisofosfatídico derivado do câncer de ovário estimula  
16 a diferenciação de células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo humano em CAFs  
17 (JEON et al., 2008). Além disso, pesquisadores descobriram que a interação entre as células  
18 epiteliais do ovário e estroma foi um fator importante na tumorigênese do ovário em um  
19 modelo de rato (GREENAWAY et al., 2008).

20

21 1.5 Estroma no Câncer de Ovário

22

1 Estudos indicam que a inflamação é um fator de risco para o câncer de ovário, onde a  
2 resposta inflamatória está envolvida em quase todas as fases do desenvolvimento de tumores  
3 (KROCKENBERGER et al., 2008).

4 Tem sido sugerido que o crescimento e a progressão do carcinoma de ovário possam  
5 estar relacionados a um fenômeno local de imunossupressão induzida por citocinas que  
6 podem fornecer um estado de privilégio imunitário no local do tumor, permitindo o  
7 desenvolvimento do tumor como mecanismo de escape (RABINOVICH et al., 2010).

8 Um dos focos principais de pesquisas com câncer de ovário tem sido a própria célula  
9 tumoral transformada, enquanto o papel do estroma tumoral na tumorigênese, especialmente  
10 os fibroblastos, que são os principais componente do estroma, tem sido amplamente  
11 explorados (ZHANG et al., 2011). Como já foi dito anteriormente, os fibroblastos associados  
12 ao câncer adquirem um fenótipo ativado. Tais fibroblastos contribuem para a metástase do  
13 câncer de ovário, promovendo a angiogênese, linfangiogênese e invasão tumoral (FRANCO  
14 et al., 2012; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2014).

15 Um trabalho realizado com pacientes com câncer de ovário tratadas com terapia  
16 neoadjuvante seguida de cirurgia, o estudo imunohistoquímico de cortes do tumor foi  
17 realizado e a expressão da proteína de ativação dos fibroblastos foi encontrada em 86% dos  
18 casos, além de estar associada a casos de recorrência da doença. Em outro estudo de mesmas  
19 características, a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso esteve presente em 95% do estroma  
20 associado ao tumor (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2014).

21 Zhang et al. (2011) realizaram uma pesquisa avaliando a expressão imunohistoquímica  
22 de  $\alpha$ -actina de músculo liso ou proteína de ativação de fibroblastos em tumores benignos,  
23 malignos e borderlines de ovário, além de verificar a densidade de vasos linfáticos e de  
24 microvasos nas lesões. Não foi encontrada expressão desses fibroblastos associados ao câncer

1 em tecido ovariano normal, somente a expressão de  $\alpha$ -SMA detectada em pericitos vasculares,  
2 mas não nos fibroblastos estromais. Os tecidos malignos foram o que obtiveram maior  
3 expressão de CAFs, que também foram associados com estadiamento avançado da doença,  
4 ocorrência de metástase para linfonodos e omento, aumento da densidade de vasos linfáticos e  
5 de microvasos nas lesões. Em cultura in vitro, CAFs isolados de tecido de câncer epitelial de  
6 ovário induziram maior invasão e migração das células cancerígenas em relação aos  
7 fibroblastos isolados em tecido ovariano normal.

8 Sugere-se que os fibroblastos associados ao câncer expressem citocinas pró-  
9 inflamatórias como IL-6, COX-2 e CXCL1 no estroma do carcinoma de ovário e mama  
10 (SCHAUER et al., 2011; EREZ et al., 2013). Em particular, a IL-6 é secretada por  
11 macrófagos em ascite de tumores de ovário em estágio avançado (TAKAISHI et al., 2010).

12 Os CAFs desempenham um papel importante na progressão maligna do câncer,  
13 incluindo a iniciação, proliferação, invasividade e metástase de células cancerosas no câncer  
14 epitelial de ovário (YANG et al., 2013).

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 1 2. JUSTIFICATIVA

2

3 O câncer de ovário é uma malignidade que constitui importante causa de morte por  
4 neoplasia ginecológica em mulheres, sendo a neoplasia ginecológica mais letal. Trata-se de  
5 uma das neoplasias mais difíceis de ser detectada precocemente. Apesar do melhor  
6 prognóstico em pacientes que apresentam doença localizada, avaliações retrospectivas  
7 demonstram que 50% dessas pacientes sofrem recorrência e vão a óbito, apesar da terapia  
8 apropriada. A maioria das pacientes se encontra em estadiamentos III e IV (FIGO) no  
9 momento do diagnóstico. Nesses casos, a principal estratégia terapêutica é a cirurgia de  
10 citorredução, seguida de quimioterapia. Apesar dos esquemas quimioterápicos derivados da  
11 platina e, mais recentemente, dos taxanos, os resultados do tratamento não têm obtido  
12 melhora importante nas últimas décadas. Nos estadiamentos I e II, a sobrevida em 5 anos  
13 varia de 80 a 95%, enquanto que nos estadiamentos III e IV, essa percentagem é de apenas 5 a  
14 15%. Portanto, são necessárias novas estratégias de tratamento para complementar a  
15 terapêutica do câncer de ovário, e a descoberta de novos fatores prognósticos é importante  
16 para guiar melhor o tratamento.

17

18

19

20

21

22

23

24

### 3. OBJETIVOS

1. Investigar a expressão imunohistoquímica de dois marcadores de fibroblastos associados ao câncer (CAFs), a  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) e a proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos (FAP), no compartimento estromal de neoplasias benignas e malignas epiteliais de ovário.

2. Relacionar a expressão de  $\alpha$ -SMA e FAP, no compartimento estromal, com fatores prognósticos no carcinoma epitelial de ovário.

#### 4. HIPÓTESE

A expressão imunohistoquímica da  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e da proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos (FAP), no compartimento estromal de neoplasias epiteliais de ovário é maior nas neoplasias malignas de ovário e tem relação com fatores de pior prognóstico nos tumores malignos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas de forma prospectiva 56 pacientes atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia / Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, com indicação de tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos (MURTA et al., 2004; MURTA & NOMELINI, 2006).

Foram revisados os resultados anátomo-patológicos em parafina, sendo então incluídas no estudo as pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia benigna de ovário (n=28) e neoplasia maligna epitelial de ovário (n=28).

Foram registrados dados como idade, paridade, tabagismo, grau histológico, estadiamento (FIGO), tipo histológico, metástases em linfonodos, resposta à quimioterapia (completa, parcial), sobrevida livre de doença maior ou igual a 24 meses. Para a avaliação da sobrevida livre de doença, foram excluídas as pacientes que perderam o seguimento. As características das pacientes foram descritas na Tabela 1.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 34770014.4.0000.5154 (Anexo A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de cada paciente incluída no estudo (Anexo B).

1 **Tabela 1:** Características gerais dos grupos de pacientes com Neoplasia Ovariana, atendidas  
2 no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG (Média±DP)

	Neoplasias Benignas	Neoplasias Malignas
	n = 28	n = 28
Idade/anos	47,6±10,5	49,9±14,1
Gravidez	3,0±1,9	2,5±1,9
Paridade	2,8±1,8	2,2±1,7
Idade da Menarca	13,1±1,6	13,1±1,7
Idade da Menopausa	48,0±6,2	49,7±4,2

3

#### 4 **Critérios de inclusão**

5 Diagnóstico pós-operatório de neoplasia maligna ou benigna de ovário pelo  
6 anátomo-patológico em parafina.

7

#### 8 **Critérios de exclusão**

9 a) Torção do pedículo anexial, b) neoplasia maligna secundária de ovário  
10 (metástase), c) tratamento antineoplásico, d) neoplasias não epiteliais de ovário, e) recidiva; f)  
11 imunossupressão, g) uso de medicações imunossupressoras.

12

#### 13 **Estudo anátomo-patológico**

14

15 Foi realizado pela Disciplina de Patologia Especial da UFTM nos cortes embebidos  
16 em parafina, sendo que os casos foram revisados por um observador da disciplina de  
17 Patologia Especial, para a escolha dos melhores cortes para a realização de estudo

1 imunohistoquímico. A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos foram  
2 realizados de acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology and*  
3 *Obstetrics* – FIGO (ZEPPERLICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

4

### 5 **Imunohistoquímica**

6

7 Foi realizado estudo imunohistoquímico de dois marcadores de fibroblastos  
8 associados ao câncer (CAFs), a  $\alpha$  - atina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e a proteína  $\alpha$  de ativação  
9 dos fibroblastos (FAP), e a leitura das mesmas no compartimento estromal de neoplasias  
10 benignas e malignas epiteliais de ovário, conforme detalhado a seguir.

11 Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica foram processados em parafina e  
12 revisados por patologista experiente. Os casos selecionados foram submetidos a novos cortes  
13 (4  $\mu$ m) em lâminas silanizadas (ATPS - Silano, Sigma® A3648), empregando-se o Sistema de  
14 detecção de Polímeros Novolink™. As lâminas permaneceram em estufa (56°C, 24 h) e a  
15 seguir foram desparafinizadas (3 banhos de xilol, 5 min cada) e desidratadas (3 banhos de  
16 álcool absoluto e 1 banho de álcool a 80%, 10 seg cada). Após, as lâminas permaneceram em  
17 banho (PBS, pH 7.2, 5 min), para hidratação.

18 Em seguida foi realizada a recuperação dos antígenos. As lâminas foram colocadas  
19 em tubos de citologia contendo solução tampão Citrato 10 mM (pH 6,0) ou Tris-EDTA,  
20 conforme orientação do fabricante, e colocados dentro de uma panela Pascal, que foi  
21 completada com água destilada até o limite indicado durante 30 minutos a uma temperatura  
22 de 100°C. Então, os tubos foram retirados de dentro da panela e colocados sobre a bancada  
23 para seu resfriamento.

1           Após, para neutralizar a peroxidase endógena utilizou-se o Bloquador de Peroxidase  
2 durante 5 minutos. Lavadas em PBS durante 5 minutos. Incubadas com Bloqueador de  
3 Proteínas por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS durante 5 minutos. Incubadas  
4 com anticorpo primário diluído em BSA (2%) - 18 h, em câmara úmida, 4 ° C. Após a  
5 incubação *overnight* a 4 ° C com os anticorpos específicos anti- $\alpha$ -SMA e anti-FAP, as lâminas  
6 foram colocadas à temperatura ambiente (15 min), lavadas (PBS) durante 5 minutos e secas.  
7 Incubadas com Pós Primário durante 30 minutos. Lavadas em PBS durante 5 minutos.  
8 Incubadas com Novolink™ Polímero durante 30 minutos. Lavadas em PBS durante 5  
9 minutos.

10           Após lavagem em PBS, as lâminas foram reveladas através de solução cromógena  
11 (Diaminobenzidine - DAB), por 5 min. Após, as lâminas foram lavadas (água corrente) e  
12 contra-coradas em hematoxilina de Harris. Finalmente as lâminas foram imersas em 3 banhos  
13 de álcool absoluto (10 segundos cada), para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol  
14 fenicado e 3 banhos de xilol (5 minutos cada). As lamínulas foram adicionadas sobre as  
15 lâminas com *entellan* para posterior análise.

16           Foram utilizados controles positivo e negativo para cada anticorpo. Três  
17 observadores avaliaram as lâminas. A intensidade de imunomarcção no estroma foi avaliada  
18 subjetivamente utilizando-se 0 a 3: 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação  
19 moderada), 3 (marcação forte) (OZEL et al., 2006).

20  
21  
22  
23  
24

## **Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo GraphPad InStat® software. No estudo imunohistoquímico, a concordância entre os dois observadores foi realizada através do kappa:  $\kappa < 0,4$ : concordância fraca;  $0,4 \leq \kappa < 0,8$ : concordância moderada;  $0,8 \leq \kappa < 1,0$ : concordância forte;  $\kappa = 1,0$ : concordância perfeita (ARANGO, 2001). As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ . Um único caso discordante foi reavaliado e o resultado foi definido por consenso. Foi utilizado o teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 0,05.

## 5. RESULTADOS

As tabelas 2 e 3 mostram os subtipos histológicos das neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário, respectivamente. Em relação às neoplasias malignas (n=28), a média de idade foi de  $49,9 \pm 14,1$  anos, a média de paridade foi de  $2,2 \pm 1,7$  partos, e a idade média da menarca foi  $13,1 \pm 1,7$  anos. Em relação ao uso de método contraceptivo, 2 (7,1%) utilizavam contraceptivo hormonal, nenhuma utilizava preservativo, e 4 (14,3%) foram submetidas à laqueadura tubária. Seis pacientes (21,4%) eram tabagistas.

Em relação às neoplasias benignas (n=28), a média de idade foi de  $47,6 \pm 10,5$  anos, a média de paridade foi de  $2,8 \pm 1,8$  partos, e a idade média da menarca foi  $13,1 \pm 1,6$  anos. Em relação ao uso de método contraceptivo, 6 (21,4%) utilizavam contraceptivo hormonal, nenhuma utilizava preservativo, e 13 (46,4%) foram submetidas à laqueadura tubária. Seis pacientes (21,4%) eram tabagistas.

Quanto ao estadiamento (FIGO), 9 (32,1%) estavam em estágio IA, 2 (7,1%) IB, 2 (7,1%) IC, 1 (3,6%) IIA, 1 (3,6%) IIIA, 1 (3,6%) IIIB, 10 (35,7%) IIIC e 2 (7,1%) IV (Tabela 4).

1 **Tabela 2.** Distribuição das neoplasias benignas de ovário (n=28) segundo o diagnóstico  
 2 histopatológico.

Neoplasias benignas	n	%
Cistoadenoma seroso e tumor de Brenner	1	3,6
Cistoadenoma mucinoso e tumor de Brenner	2	7,1
Cistoadenoma mucinoso	9	32,1
Cistoadenoma seroso	16	57,1

3

4 **Tabela 3.** Distribuição das neoplasias malignas de ovário (n=28) segundo o diagnóstico  
 5 histopatológico.

Neoplasias Malignas	n	%
Cistoadenocarcinoma seroso	10	35,7
Cistoadenocarcinoma mucinoso <i>borderline</i>	9	32,1
Adenocarcinoma	2	7,1
Cistoadenocarcinoma mucinoso	2	7,1
Adenocarcinoma anaplásico papilífero	1	3,6
Adenocarcinoma endometriode	1	3,6
Carcinoma de células claras	1	3,6
Cistoadenocarcinoma seroso <i>borderline</i>	1	3,6
Tumor endometriode proliferativo atípico <i>borderline</i>	1	3,6

1 **Tabela 4:** Distribuição das neoplasias malignas de ovário conforme o estadiamento FIGO, das  
2 pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da UFTM, Uberaba-MG.

Estadiamento FIGO	n	%
IA	9	32,1
IB	2	7,1
IC	2	7,1
IIA	1	3,6
IIIA	1	3,6
IIIB	1	3,6
IIIC	10	35,7
IV	2	7,1

3

4

5 As tabelas 5 e 6 e a figura 1 demonstram as diferenças na marcação tecidual estromal  
6 por imunohistoquímica dos fibroblastos associados ao câncer entre neoplasias malignas e  
7 benignas de ovário. Para a leitura da expressão imunohistoquímica foi excluída uma paciente  
8 com neoplasia maligna de ovário da análise da FAP e outra paciente também com neoplasia  
9 maligna de ovário para a análise da  $\alpha$  - SMA, pois os cortes não estavam satisfatórios,  
10 permanecendo 27 pacientes para a avaliação da imunomarcção de cada anticorpo (Figura 2).

11

12

1 **Tabela 5.** Marcação imunohistoquímica da Proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos (FAP) em  
 2 neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário.

	Forte intensidade de FAP	Fraca intensidade de FAP	p
	(2 / 3)	(0 / 1)	
Neoplasias benignas (n=28)	4 (14.3%)	24 (85.7%)	
Neoplasias malignas (n=27)	11 (40.7%)	16 (59.3%)	<b>0.0366</b>

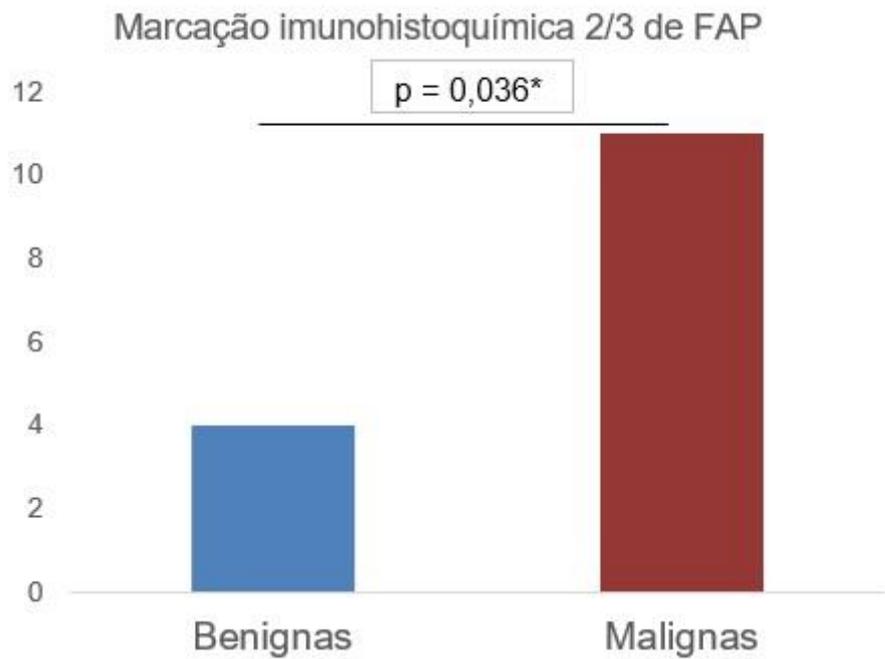
3 Teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 0,05.

4

5 **Tabela 6.** Marcação imunohistoquímica da  $\alpha$ -actina de músculo liso (alfa-SMA) em  
 6 neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário.

	Forte intensidade de $\alpha$ -SMA	Fraca intensidade de $\alpha$ -SMA	p
	(2 / 3)	(0 / 1)	
Neoplasias benignas (n=28)	18 (60,7%)	10 (39,3%)	
Neoplasias malignas (n=27)	16 (59,3%)	11 (40,7%)	0,7848

7 Teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 0,05.



1

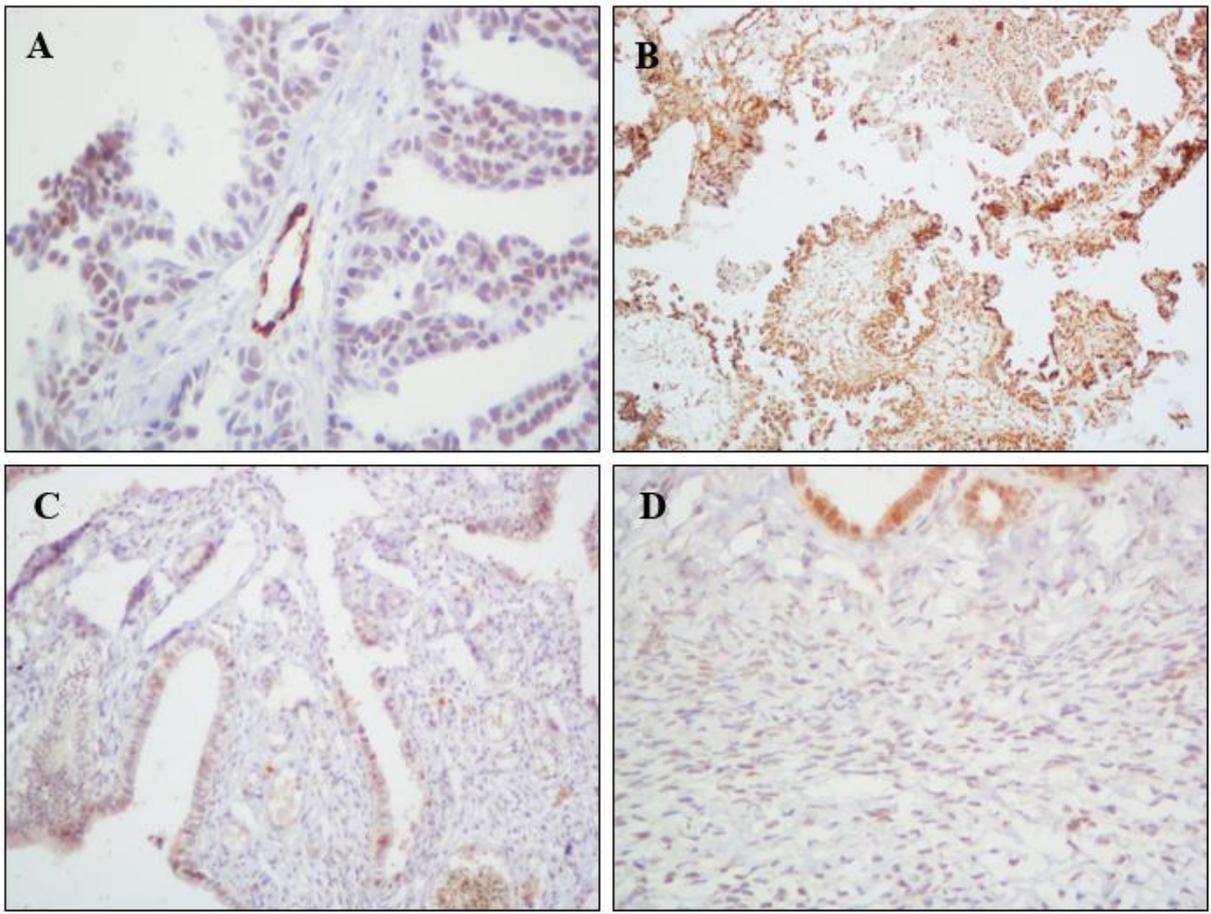
2 **Figura 1.** Diferenças na marcação imunohistoquímica da Proteína  $\alpha$  de ativação dos  
3 fibroblastos (FAP) em neoplasias benignas e neoplasias malignas de ovário.

4 Fonte:Próprio autor

5

6

7



1

2 Fonte: Próprio autor.

3 **Figura 2.** Marcações imunohistoquímicas. Cortes histológicos de neoplasia ovariana. A: fraca  
4 marcação estromal de A-actina de músculo liso em neoplasia maligna de ovário (400x); B:  
5 forte marcação estromal de A-actina de músculo liso em neoplasia maligna de ovário (100x);  
6 C: fraca marcação estromal de FAP em neoplasia benigna de ovário (200x); D: forte  
7 marcação estromal de FAP em neoplasia benigna de ovário (400x).

8

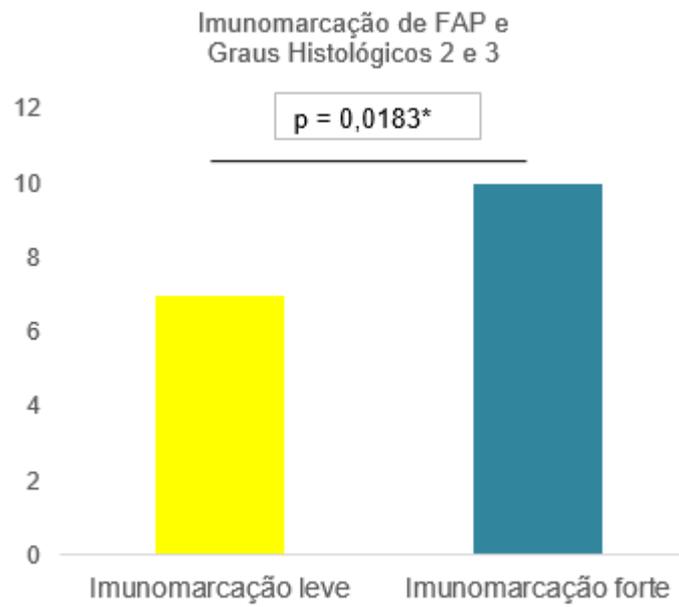
9 A Tabela 7 e a figura 3 mostram a relação entre fibroblastos associados ao câncer e  
10 fatores prognósticos. As imunomarcações 2/3 para FAP foram significativamente  
11 relacionadas aos graus histológicos 2 e 3 ( $p = 0,0183$ ). Não houve diferença significativa em  
12 relação à expressão da  $\alpha$ -actina do músculo liso e fatores prognósticos.

1 **Tabela 7:** Distribuição dos fibroblastos associados ao câncer com imunomarcção estromal  
 2 2/3 de acordo com o grau histológico, estadiamento, metástases em linfonodos, resposta a  
 3 quimioterapia e sobrevida livre da doença.

		FAP	$\alpha$ -Actina
Grau histológico	1 (n=11)	1 (9,1%)	6 (54,5%)
	2/3 (n=16)	<b>10 (62,5%)*</b>	10 (62,5%)
Estadiamento (FIGO)	I/II (n=14)	7 (50%)	7 (50%)
	III/IV (n=13)	8 (61,5%)	9 (69,2%)
Metástases em Linfonodos	Negativa (n=12)	7 (58,3%)	7 (58,3%)
	Positiva (n=4)	2 (50%)	3 (75%)
Resposta à quimioterapia	Completa (n=10)	5 (50%)	5 (50%)
	Parcial (n=2)	1 (50%)	2 (100%)
	Sem resposta (n=5)	4 (80%)	4 (80%)
Sobrevida livre da doença	> 24 meses (n=10)	6 (60%)	9 (90%)
	$\leq$ 24 meses (n=14)	4 (28,6%)	5 (35,7%)

4 \*p = 0,0183, comparando o grau histológico 2/3 (Teste Exato de Fisher). Na avaliação da  
 5 resposta à quimioterapia com a imunomarcção de  $\alpha$ -actina, o n estudado foi de 17 pacientes,  
 6 já que umas das lâminas foi excluída por corte não representativo.

1



2

3 **Figura 3:** Distribuição da Proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos de acordo com o grau  
4 histológico, sendo imunomarcção leve (0 e 1), e imunomarcção forte (2 e 3).

5 Fonte: Próprio autor

6

7

8

9

10

11

12

13

14

1

## 2       **5   DISCUSSÃO**

3

4           O presente estudo teve como objetivo principal identificar e correlacionar  
5   marcadores no compartimento estromal ovariano e correlacioná-los com as neoplasias  
6   ovarianas benignas e malignas. Segundo Mhaweck-Fauceglia et al (2014), os componentes  
7   estromais são comumente constituintes de um grande percentual do volume tumoral, e o  
8   microambiente tumoral é essencial para a sobrevivência do mesmo. As células fibroblásticas  
9   estromais adquirem fenótipos que são perpetuamente ativados, e sua identificação é feita pela  
10   expressão da  $\alpha$ -actina de músculo liso e proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos, os quais são  
11   chamados de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (MHAWECH-FAUCEGLIA et al.,  
12   2014).

13           Em nosso estudo, a proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos foi expressa de forma  
14   significativa em neoplasias malignas quando comparadas com neoplasias benignas. Isso  
15   ocorre devido a reações de granulações de tecidos, processos fibróticos associados ao câncer  
16   em processos de cicatrização de tecidos normais e ser altamente considerada um marcador  
17   específico de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (SPAETH et al., 2009; MHAWECH-  
18   FAUCEGLIA et al., 2014). Os fibroblastos associados ao câncer manifestam significância na  
19   progressão tumoral, no suporte estrutural e funcional no microambiente tumoral. A população  
20   dos fibroblastos associados ao câncer é vasta e é composta por diversos marcadores, incluindo  
21   a proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos e  $\alpha$ -actina do músculo liso os quais foram os  
22   marcadores do presente estudo (SPAETH et al., 2009; MHAWECH-FAUCEGLIA et al.,  
23   2014).

1 CAFs são responsáveis pela ativação dos fibroblastos que possuem significância  
2 biológica em processos de linfangiogênese, angiogênese, tumorigênese, na degradação  
3 celular, na produção da matriz extracelular e invasão tumoral e processos metastáticos. Em  
4 adição participam na produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, e  
5 principalmente em processos imunomodulatórios (SPAETH et al., 2009; MHAWECH-  
6 FAUCEGLIA et al., 2014).

7 A maior expressão da proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos é um indicativo de  
8 progressão da doença, sendo caracterizada como precursor de malignidade (SPAETH et al.,  
9 2009), e manifestada em diversos tipos de cânceres. Estudos confirmam que ela vem sendo  
10 explorada em terapias contra o câncer e imunoterapias combinadas por ser um fator de  
11 supressão imune no microambiente tumoral e permitir o direcionamento imunogenético no  
12 tratamento de alguns cânceres onde há o aumento da expressão da FAP (SCOTT et al., 2003;  
13 CHEN et al., 2015; JIANG et al., 2016).

14 De um modo geral, as imunoterapias associadas com a FAP podem manifestar  
15 resultados significantes terapêuticos em relação a alguns tumores sólidos e células  
16 metastáticas por inibir o crescimento tumoral e ajudar na remissão de células cancerígenas, o  
17 que torna a FAP um alvo imunoterápico e indicador de agressividade da doença e pior  
18 prognóstico (JIANG et al., 2016).

19 Não houve diferença estatística na expressão imunohistoquímica da  $\alpha$ -actina de  
20 músculo liso em nosso trabalho quando analisada em neoplasias benignas e malignas  
21 ovarianas, sem relação com fatores prognósticos.

22 Segundo Kobayashi et al (1992) a actina precursora da  $\alpha$ -actina de músculo liso  
23 corresponde a uma proteína intracelular bastante abundante, polimerizada dentro de  
24 microfilamentos que são cruciais para motilidade, morfologia e estrutura citoesquelética

1 estrutural. Seus filamentos são estruturados em redes e feixes, a partir daí surgem isoformas  
2 da actina, dentre elas a  $\alpha$ -actina de músculo liso, onde é predominante no interior das células  
3 musculares lisas vasculares e extremamente importante nos processos de fibrinogênese. A  
4 expressão da mesma está relacionada com ativação dos miofibroblastos, que correspondem a  
5 uma forma celular fibroblástica a qual sua forma parcial sofreu diferenciação em relação a  
6 uma linhagem celular muscular lisa (CHERNG; YOUNG; MA, 2008; ELBERG et al., 2008).

7 Sua expressão tanto nas neoplasias benignas quanto nas malignas de ovário se deve  
8 ao fato de algumas identificações de CAFs serem bem identificadas pela vasta expressão de  $\alpha$ -  
9 SMA, onde sua expressão isolada não manifesta ou expressa fibroblastos associados ao  
10 câncer. Com isso, outros marcadores de fibroblastos devem ser utilizados, como a vimentina,  
11 fibronectina e a proteína de ativação dos fibroblastos utilizada em nosso estudo, que segundo  
12 alguns autores, é considerada o principal marcador de fibroblastos (PAULSSON & MICKE,  
13 2014).

14 As  $\alpha$ -SMAs são capazes de acelerar processos cicatriciais de feridas através de  
15 contração de extremidades. Após o processo cicatricial, essas células sofrem apoptose porém  
16 em alguns casos, esses eventos apoptóticos não acontecem o que leva a persistência de  
17 miofibroblastos, expandindo os processos de contração e a matriz extracelular.(CHERNG;  
18 YOUNG; MA, 2008).

19 A  $\alpha$ -SMA corresponde um tipo celular valioso que contribui na deposição de matriz  
20 extracelular, principalmente em processos de fibroses. A regulação da sua transcrição tem  
21 sido avaliada e estudos atuais comprovam claramente que existem atividades promotoras de  
22 alfa-SMA reguladas por mecanismos comuns em diferentes tipos celulares (ELBERG et al.,  
23 2008). Esses eventos se caracterizam pela diferenciação de miofibroblastos diante a  
24 cicatrização de feridas e reparação de tecidos. A intensa contratilidade manifestada pelos

1 miofibroblastos é adequada para a remodelação funcional tecidual mas se torna abusiva em  
2 patologias fibróticas, cicatriz hipertrófica e durante reações do estroma com os tumores  
3 (CHERNING; YOUNG; MA, 2008).

4 Os fatores prognósticos são importantes para o direcionamento do tratamento do  
5 câncer pelos oncologistas para a tomada de decisões quanto a terapia a ser utilizada.  
6 Evidências apontam que o estroma contém dados prognósticos peculiares evidenciados pela  
7 manifestação de células da vasculatura e células imunes em processos de progressão das  
8 neoplasias. Em adição, fortes indícios apontam que os fibroblastos estromais (CAFs) possuem  
9 papel fundamental no processo de formação tumoral. Com isso pode-se afirmar que dados  
10 moleculares de CAFs são muito relevantes para o acompanhamento clínico tumoral. Diversos  
11 estudos demonstram que o comportamento e as características fibroblásticas influenciam em  
12 respostas terapêuticas. Assim, numerosas estratégias têm sido abordadas utilizando CAFs para  
13 abordagem de fatores prognósticos (ERRARTE et al., 2016).

14 Nossos achados em relação à maior expressão de FAP em neoplasias malignas se  
15 correlaciona com estudos de Errarte et al (2016), que encontrou uma maior expressão de FAP  
16 em tumores primários e uma associação estatisticamente significativa entre agressividade  
17 tumoral e a expressão de FAP. Nosso estudo encontrou uma maior imunomarcagem da FAP  
18 em graus histológicos menos diferenciados (2 e 3,  $p=0,0183$ ). Existem hipóteses de que o  
19 nível de FAP expressa no interior do estroma pode estar correlacionada com variáveis  
20 clinicopatológicas tradicionais, onde incluem-se grau tumoral, tamanho tumoral, subtipos do  
21 câncer, número de linfonodos acometidos, o que reflete na biologia heterogênea das células  
22 tumorais. Podemos afirmar que a FAP possui suma importância na biologia de tumores  
23 avançados detalhados pelo aumento de sua expressão. O fato de não ser encontrado

1    significância estatística nos demais fatores prognósticos avaliados poderia ser justificado pela  
2    limitação do tamanho da amostra.

3            Outros estudos que também avaliaram a expressão imunohistoquímica de FAP,  
4    relatam a sua maior expressão no estroma de cânceres colorretais, também associada ao pior  
5    prognóstico (WIKBERG et al., 2013).

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

## 6 CONCLUSÃO

A imunomarcção de proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos é mais expressiva em neoplasias malignas que em neoplasias benignas de ovário, e também em neoplasias malignas moderadamente diferenciadas e indiferenciadas comparada com neoplasias bem diferenciadas, sugerindo ser marcador de pior prognóstico. Assim, a proteína  $\alpha$  de ativação dos fibroblastos poderia, no futuro, ser um alvo potencial para novas terapias no câncer de ovário.

1

2       **10. REFERÊNCIAS**

3       **1.**     ALI-FEHMI, R. et al.. Molecular typing of epithelial ovarian carcinomas using  
4     inflammatory markers. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 301-309, 2011

5

6       **2.**     ANDERBERG, C; LI, H; FREDRIKSSON, L et al. Paracrine signaling by platelet-  
7     derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated  
8     fibroblastos. **Cancer Res**, v. 69, p. 369-378, 2009

9

10      **3.**     ANDRAE, J; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C . Role of platelet-derived growth factors  
11     in physiology and medicine. **Genes Dev**, v. 22, p. 1276–1312, 2008

12

13      **4.**     ARANGO, E G. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara  
14     Koogan, p. 93-113, 2001

15

16      **5.**     ARNOLD, J N; MAGIERA, L; KRAMAN, M et al. Tumoral immune suppression by  
17     macrophages expressing fibroblast activation protein- $\alpha$  and heme oxygenase-1. **Cancer**  
18     **Immunol. Res**, v. 2, p. 121–126, 2014

19

20      **6.**     BAE, S; PARK, C W; SON, H K et al. Fibroblast activation protein alpha identifies  
21     mesenchymal stromal cells from human bone marrow. **Br J Haematol** , v. 142, n. 5, p. 827-  
22     30, 2008

23

- 1   **7.**     BINGLE, L; BROWN, N J; LEWIS, C E. The role of tumour-associated macrophages  
2   in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol**, v. 196, n. 3, p.  
3   254-265, 2002  
4
- 5   **8.**     BISACCHI, D; BENELLI, R.; VANZETTO, C et al. Anti-angiogenesis and  
6   angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. **Cancer Detect Prev**, v. 27, n. 3, p.  
7   229-238, 2003  
8
- 9   **9.**     BREMNES, R. M.; DØNNEM, T; AL-SAAD, S et al. The role of tumor stroma in  
10  cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-  
11  small cell lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 6, n. 1, p. 209-217, 2011  
12
- 13  **10.**    BUSUTTIL, R A; GEORGE, J; TOTHILL, R W et al. A signature predicting poor  
14  prognosis in gastric and ovarian cancer represents a coordinated macrophage and stromal  
15  response. **Clin Cancer Res**, v. 20, p. 2761–2772, 2014  
16
- 17  **11.**    CAIRNS, R; PAPANDREOU, I; DENKO, N. Over coming physiologic barriers to  
18  cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. **Mol Cancer Res**, v.  
19  4, n. 2, p. 61-70, 2006  
20
- 21  **12.**    CHAPONNIER, C; GABBIANI, G. Pathological situations characterized by altered  
22  actin isoform expression. **J Pathol**, v. 204, p. 386-395, 2004  
23
- 24  **13.**    CHERNG, S; YOUNG, J; MA, H. Alpha-Smooth Muscle Actin. **J Am Sci**, , v. 4, n.  
25  4, p. 7-9, 2008

- 1   **14.**     CORVIGNO, S; WISMAN, GB; MEZHEYEUSKI, A et al. Markers of fibroblast-  
2   rich tumor stroma and perivascular cells in serous ovarian cancer: Inter- and intra-patient  
3   heterogeneity and impact on survival. **Oncotarget**, v.7, n.14, p. 18573-18584, 2016  
4
- 5   **15.**     CIUCCI, A; ZAMBONI, G F; BUTTARELLI, M et al.. Ovarian low and high grade  
6   serous carcinomas: hidden divergent features in the tumor microenvironment. **Oncotarget**,  
7   2016.  
8
- 9   **16.**     DARAÏ, E et al. Fertility and borderline ovarian tumor: a systematic review of  
10  conservative management, risk of recurrence and alternative options. **Hum Reprod**  
11 **Update**. V. 19, p. 151–166, 2013  
12
- 13 **17.**     DARBY, I; SKALLI, O; GABBIANI, G.  $\alpha$ -Smooth muscle actin is transiently  
14  expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Invest**, v. 63, p. 21-29,  
15  1990  
16
- 17 **18.**     DONG, Z., KUMAR, R., YANG, X., FIDLER, I. J. Macrophage-derived  
18  metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. **Cell**,  
19  v. 88, n. 6, p. 801-810, 1997  
20
- 21 **19.**     DORE-DUFFY, P; CLEARY, K. Morphology and properties of pericytes. **Methods**  
22 **Mol Biol**, v. 686, p. 49-68, 2011

- 1   **20.**    DRISKELL, R R; LICHTENBERGER, B M; HOSTE, E et al.. Distinct fibroblast  
2   lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, v. 504, p.  
3   277-281, 2013  
4
- 5   **21.**    DVORAK, H F. Tumors: wounds that do not heal. similarities between tumor stroma  
6   generation and wound healing. **N Engl J Med**, v. 315, p. 1650-1659, 1986  
7
- 8   **22.**    EARLE, C C et al. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for  
9   ovarian cancer patients. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, p. 172–180, 2006  
10
- 11   **23.**    EREZ, N; GLANZ, S; RAZ, Y et al. Cancer associated fibroblasts express pro-  
12   inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. **Biochem Biophys Res Commun**,  
13   v. 437, n. 3, p. 397-402, 2013  
14
- 15   **24.**    ERRARTE, P; GUARCH, R; PULIDO, R et al . The Expression of Fibroblast  
16   Activation Protein in Clear Cell Renal Cell Carcinomas Is Associated with Synchronous  
17   Lymph Node Metastases. **PLoS One**. v. 11, n. 12, p. e0169105, 2016  
18
- 19   **25.**    FRANCO, O E; SHAW, A K; STRAND, D W et al . Cancer associated fibroblasts are  
20   a rate-limiting determinant for tumour progression. **Semin Cell Dev Biol**, v. 21, p. 33–39,  
21   2012  
22
- 23   **26.**    GALLIHER, A J; NEIL, J R.; SCHIEMANN, W P. Role of transforming growth  
24   factor-beta in cancer progression. **Future Oncol**, v. 2, p. 743–763, 2006

- 1   **27.**   GIANNONI, E ; BIANCHINI, F ; MASIERI , L et al.. Reciprocal activation of  
2   prostate câncer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial mesenchymal  
3   transition and cancer stemness. **Cancer Res**, v. 70, n. 17, p. 6945-56, 2010  
4
- 5   **28.**   GREENAWAY, J; MOOREHEAD, R.; SHAW, P et al . Epithelial-stromal  
6   interaction increases cell proliferation, survival and tumorigenicity in a mouse model of  
7   human epithelial ovarian cancer, **Gynecol Oncol**, v. 108, p. 385–394, 2008  
8
- 9   **29.**   HAMBURG-SHIELDS, E; DINUOSCIO, G J; Mullin, N K et al. Sustained  $\beta$ -catenin  
10   activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular  
11   matrix protein-coding genes. **J Pathol**, v. 235, p. 686—697, 2015  
12
- 13   **30.**   HAMMERLING, G J; GANSS, R. Vascular integration of endotelial progenitors  
14   during multistep tumor progression. **Cell Cycle**, 2006, v. 5, n. 5, p. 509-511, 2006  
15
- 16   **31.**   JAIN, R K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 685-9,  
17   2003  
18
- 19   **32.**   JEON, E S; MOON, H J; LEE, M J et al.. Cancerderived lysophosphatidic acid  
20   stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells, **Stem**  
21   **cells**, v. 26, p. 789–797 , 2008  
22
- 23   **33.**   JIANG, GM; XU, W; DU, J et al. The application of  
24   the fibroblast activation protein  $\alpha$ -targeted immunotherapy strategy. **Oncotarget**, v. 7, n. 22,  
25   p. 33472-82, 2016

- 1 **34.** KAIJSER, J; SAYASNEH, A; VAN HOORDE K et al. Presurgical diagnosis of  
2 adnexal tumours using mathematical models and scoring systems: a systematic review and  
3 meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v. 20, p. 449, 2014  
4
- 5 **35.** KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Rev Cancer**, v. 6, p.  
6 392–401, 2006  
7
- 8 **36.** KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in câncer. **Nature Rev Cancer**,  
9 v. 16, p. 582-598, 2016  
10
- 11 **37.** KAWASAKI, Y; IMAIZUMI, T; MATSUURA, H et al. Renal expression of alpha-  
12 smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis. **Pediatr**  
13 **Nephrol**, v. 23,n. 6, p. 913-919, 2008  
14
- 15 **38.** KOBAYASHI, H; TSURUCHI, N; SUGIHARA, K et al . Expression of alpha-  
16 smooth muscle actin in benign or malignant ovarian tumors. **Gynecol Oncol**, v. 48, n. 3, p.  
17 308-313, 1993  
18
- 19 **39.** KROCKENBERGER, M.; DOMBROWSKI, Y; WEIDLER, C et al.. Macrophage  
20 Migration Inhibitory Factor (MIF) Contributes to the Immune Escape of Ovarian Cancer by  
21 Downregulating NKG2D1. **J Immunol**, v. 180, p. 7338-7348, 2008  
22
- 23 **40.** KURMAN, R J; SHIH, Ie-Ming. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian  
24 cancer: a proposed unifying theory. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 3, p. 433-443, 2010

- 1 41. KURMAN, R J; SHIH, Ie-Ming. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of  
2 epithelial ovarian cancer - Shifting the paradigm. **Human Pathology**, v. 42, n. 7, p. 918–931,  
3 2011  
4
- 5 42. KURMAN, R J. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous  
6 carcinoma. **Ann Oncol**, v. 24, n.10, p. 16-21, 2013  
7
- 8 43. LAMBERT, L A; PERRI, H; MEEHAN, T J. Evolution of duplications in the  
9 transferrin family of proteins. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 140, n. 1 p.  
10 11-25, 2005  
11
- 12 44. LEE, C C; LIU, K J; Huang, T S. Tumor-associated macrophage: Its role in tumor  
13 angiogenesis. **J Cancer Mol**, v. 2, n. 4, p. 135-140, 2006  
14
- 15 45. LEUNG, C S; YEUNG, T L; YIP, K P et al. Calcium-dependent  
16 FAK/CREB/TNNC1 signalling mediates the effect of stromal MFAP5 on ovarian cancer  
17 metastatic potential. **Nat Commun**, v. 5, p. 5092, 2014  
18
- 19 46. MANTOVANI, A; ALLAVENA, P; SICA, A. Tumour-associated macrophages as a  
20 prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. **Eur J Cancer**,  
21 v. 40, n. 11, p. 1660-1667, 2004  
22
- 23 47. MHAWECH-FAUCEGLIA, P; WANG, D; SAMRAO, D et al.. Clinical Implications  
24 of Marker Expression of Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs) in Patients with Epithelial

- 1 Ovarian Carcinoma After Treatment with Neoadjuvant Chemotherapy. **Cancer**  
2 **Microenvironment**, v. 7, n. 1-2, p. 33–39, 2014  
3
- 4 **48.** MHAWECH-FAUCEGLIA, P; YAN, L ; SHARIFIAN, M et al. Stromal Expression  
5 of Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP) Predicts Platinum Resistance and Shorter  
6 Recurrence in patients with Epithelial Ovarian Cancer. **Cancer Microenviron**, v. 8, n. 1, p.  
7 23-31, 2015  
8
- 9 **49.** MUELLER, M M; FUSENIG, N E . Friends or foes-bipolar effects of the tumour  
10 stroma in cancer. **Nature Rev Cancer**, v. 4, p. 839–849, 2004  
11
- 12 **50.** MURTA, E F ; NOMELINI, R S. Early diagnosis and predictors of malignancy of  
13 adnexal masses. **Curr Opin Obstet Gyn**, v.18, n. 1, p. 14-9, 2006  
14
- 15 **51.** MURTA, E F C; SILVA, C S; GOMES, R A S et al. Ultrasonographic criteria and  
16 tumor marker assay are good procedures for the diagnosis of ovarian neoplasia in preselected  
17 outpatients. **Eur. J. Gynaecol. Oncol** , v. 25, p. 707-12, 2004  
18
- 19 **52.** NAKATANI, T; HONDA, E; HAYAKAWA, S et al. Effects of decorin on the  
20 expression of alpha-smooth muscle actin in a human myofibroblast cell line. **Mol Cell**  
21 **Biochem**, v. 308, n. 1-2, p. 201-207, 2008  
22
- 23 **53.** NAVARRO, R ; COMPTE, M ; ÁLVAREZ-VALLINA, L et al.. Immune Regulation  
24 by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity. **Front Immunol**, v. 7, p. 480, 2016

- 1 **54.** OKAMOTO-INOUE, M.; TANIGUCHI, S; SADANO, H et al. Alteration in  
2 expression of smooth muscle alpha-actin associated with transformation of rat 3Y1 cells.  
3 **Journal of Cell Science**, v.96, p. 631-637, 1990  
4
- 5 **55.** OSTMAN, A; AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth –  
6 bystanders turning into key players. **Curr Opin Genet**, v. 19, p. 67–73, 2009  
7
- 8 **56.** OZEL, E; PEŞTERELI, HE; SIMŞEK, T et al. Expression of cyclooxygenase-2 and  
9 inducible nitric oxide synthase in ovarian surface epithelial carcinomas: is there any  
10 correlation with angiogenesis or clinicopathologic parameters? **Int J Gynecol Cancer** v. 16,  
11 p. 549–555, 2006  
12
- 13 **57.** OZERDEM, U; STALLCUP, W B. Early contribution of pericytes to angiogenic  
14 sprouting and tube formation. **Angiogenesis**, v. 6, n. 3, p. 2419, 2003  
15
- 16 **58.** PAULSSON, J; MICKE, P. Prognostic relevance of cancer-associated  
17 fibroblasts in human cancer. **Semin Cancer Biol**. v. 25, p. 61-8, 2014  
18
- 19 **59.** PAZOS, M C; NADER, H B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular  
20 matrix and associated components. **Braz J Med Biol Res**, v. 40,n. 8, p. 1025-1035, 2007  
21
- 22 **60.** PIETRAS, K; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma.  
23 **Exp Cell Res**, v. 316, n. 8, p. 1324-1331, 2010

- 1 **61.** RABINOVICH, A; MEDINA, L; PIURA et al . Expression of IL-10 in human  
2 normal and cancerous ovarian tissues and cells. **Eur Cytokine Netw**, v. 21, n. 2, p. 122-128,  
3 2010  
4
- 5 **62.** ROUGER, C; PAGIE, S; DERBRÉ, S et al. Prenylated Polyphenols from Clusiaceae  
6 and Calophyllaceae with Immunomodulatory Activity on Endothelial Cells. **PLoS One**, v.11,  
7 n. 12, p. e0167361, 2016  
8
- 9 **63.** RYNER, L; GUAN, Y; FIRESTEIN, R et al. Upregulation of periostin and reactive  
10 stroma is associated with primary chemoresistance and predicts clinical outcomes in epithelial  
11 ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, v. 21, p. 2941–2951, 2015  
12
- 13 **64.** SCHAUER, I. G; SOOD, A. K; MOK, S et al . Cancer-associated fibroblasts and their  
14 putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer.  
15 **Neoplasia**, v. 13, p. 393–405, 2011  
16
- 17 **65.** SCOTT, AM; WISEMAN, G; WELT, S et al . A Phase I dose-  
18 escalation study of sibrutinib in patients with advanced or metastatic B-cell non-Hodgkin's lymphoma  
19 protein-positive cancer. **Clin Cancer Res**. v. 9, n. 5, p. 1639-47, 2003  
20
- 21 **66.** SHEN, Cherng; JENNY, Young; HONGBAO, Ma, Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -  
22 SMA) **The Journal of American Science**, v. 4, n. 4, 2008  
23
- 24 **67.** SICA, A; SACCANI, A; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: a  
25 molecular perspective. **Int Immunopharmacol**, v. 8, p. 1045-1054, 2002

- 1 **68.** SICA, A; SCHIOPPA, T; MANTOVANI, A et al . Tumor-associated macrophages are  
2 a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-  
3 cancer therapy. **Eur J Cancer**, v. 42,n. 6, p. 717-27, 2006  
4
- 5 **69.** SILZLE, T; RANDOLPH, G J; KREUTZ, M et al. The fibroblast: sentinel cell and  
6 local immune modulator in tumor tissue. **Int J Cancer**, v. 108, p. 173-180, 2004  
7
- 8 **70.** SPAETH, E L; DEMBINSKI, J L; Sasser, A K et al. Mesenchymal stem cell  
9 transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network  
10 expansion and tumor progression. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e4992, 2009  
11
- 12 **71.** SUGIMOTO, H; MUNDEL, T M; KIERAN, M.W et al . Identification of fibroblast  
13 heterogeneity in the tumor microenvironment. **Cancer Biol Ther**, v. 5, p. 1640-1646, 2006  
14
- 15 **72.** SWEENEY, M D; AYYADURAI, S; ZLOKOVIC, B V. Pericytes of the  
16 neurovascular unit: key functions and signaling pathways. **Nat Neurosci**, v. 26, n. 6, p. 771-  
17 83, 2016  
18
- 19 **73.** TAKAISHI, K; KOMOHARA, Y; TASHIRO, H et al. Involvement of M2-polarized  
20 macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression  
21 via Stat3 activation, **Cancer Sci**, v. 101, p. 2128–2136, 2010  
22
- 23 **74.** TERADA, K Y; AHN, H J; KESSEL, B J. Differences in risk for type 1 and type 2  
24 ovarian cancer in a large cancer screening trial. **Gynecol Oncol**, v. 27, n. 3, p. e25, 2016  
25

- 1 **75.** TIMMERMAN, D; TESTA, AC; BOURNE, T et al. Logistic regression model to  
2 distinguish between the benign and malignant adnexal mass before surgery: a multicenter  
3 study by the International Ovarian Tumor Analysis group. v. 23, p. 8794–8801, 2005  
4
- 5 **76.** TINELLI, R; TINELLI A; TINELLI F G et al. Conservative surgery for borderline  
6 ovarian tumors: a review. **Gynecol Oncol**, v. 100, p. 185–191, 2006  
7
- 8 **77.** VAN CALSTER, B et al. Evaluating the risk of ovarian cancer before surgery using  
9 the ADNEX model to differentiate between benign, borderline, early and advanced stage inva  
10 sive, and secondary metastatic tumours: prospectivemulticentre diagnostic study. **BMJ**. v. 15,  
11 n. 349, p. g5920, 2014  
12
- 13 **78.** VAN CALSTER, B et al. Practical guidance for applying the ADNEX model from the  
14 IOTA group to discriminate between different subtypes of adnexal tumors. **Facts Views Vis**  
15 **Obgyn**, v. 7, n. 1, p. 32–41, 2015  
16
- 17 **79.** VAN CALSTER, B; VALENTIN, L; VAN HOLSBEBEKE, C et al. A novel approach to  
18 predict the likelihood of specific ovarian tumor pathology based on serum CA-125: a  
19 multicenter observational study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, p. 2420–2428,  
20 2011  
21
- 22 **80.** VAN HOLSBEBEKE, C; VAN CALSTER, B; TESTA, AC et al. Prospective internal  
23 validation of mathematical models to predict malignancy in adnexal masses: results from the  
24 international ovarian tumor analysis study. **Clin Cancer Res**, v. 15, p. 684–691, 2009

- 1 **81.** WIKBERG, M L; EDIN, S; LUNDBERG, I V et al . High intratumoral expression of  
2 fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient  
3 prognosis. *Tumour Biol.* v. 34, p. 1013–1020, 2013  
4
- 5 **82.** WINSLOW, S; LINDQUIST, K E; EDSJÖ, A et al . The expression pattern of matrix-  
6 producing tumor stroma is of prognostic importance in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 16,  
7 n.1, p. 841, 2016  
8
- 9 **83.** WOO, YL; KYRGIU, M; BRYANT, A et al. Centralisation of services for  
10 gynaecological cancers – a Cochrane systematic review<sup>13</sup>. Chaffer CL, Weinberg RA. A  
11 perspective on cancer cell metastasis. **Gynecol Oncol**, p. 126:286–290, 2012  
12
- 13 **84.** YANG, Z; XU, S; JIN, P et al. MARCKS contributes to stromal cancer-associated  
14 fibroblast activation and facilitates ovarian cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 7, n. 25,  
15 p.37649-37663, 2016  
16
- 17 **85.** ZEPPERNICK, F; MEINHOLD-HEERLEIN, I. The new FIGO staging system for  
18 ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. **Arch Gynecol Obstet** , v. 290, p. 839-  
19 842 , 2014  
20
- 21 **86.** ZHANG, Y; TANG, H; CAI, J et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute  
22 to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and  
23 tumor cell invasion. **Cancer Lett**, v. 303, n. 1, p. 47-55, 2011

1 **87.** ZIGRINO, P; LOFFEK, S; MAUCH, C. Tumor-stroma interactions: their role in the  
2 control of tumor cell invasion. **Biochimie**, v. 87, p. 321–328, 2005

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

# 11. ANEXOS

## ANEXO A

### PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do estroma em neoplasia epitelial de ovário e sua relação com fatores prognósticos

**Pesquisador:** Rosekeila Simões Nomelini

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 34770014.4.0000.5154

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 877.759

**Data da Relatoria:** 30/10/2014

##### Apresentação do Projeto:

O câncer de ovário

O câncer de ovário é uma causa comum de morte entre as neoplasias malignas ginecológicas. Cerca de três quartos dos tumores malignos de ovário apresenta-se em estadiamentos avançados no momento do diagnóstico inicial. É o câncer ginecológico de maior letalidade [1,2].

A maioria das pacientes se encontra em estadiamentos III e IV (FIGO) no momento do diagnóstico [3]. Nesses casos, a principal estratégia terapêutica é a cirurgia de citorredução, seguida de quimioterapia [4]. Apesar dos esquemas quimioterápicos derivados do platínum e, mais recentemente, dos taxanos, os resultados do tratamento não têm obtido melhora importante nas últimas décadas [5]. nos estadiamentos I e II, a sobrevida em 5 anos varia de 80 a 95%, enquanto que nos estadiamentos III e IV, essa percentagem é de apenas 5 a 15% [5-7].

Os marcadores tumorais são substâncias relacionadas à presença ou à progressão de um tumor. O CA - 125 (cancer antigen 125) é um biomarcador não específico para o câncer de ovário, podendo estar elevado no primeiro trimestre da gestação, endometriose, infecções pélvicas e outros tipos de câncer [8]. Mas se associado a outros como o CA - 15.3, CA - 72.4 e CA - 19.9, pode ter aplicação no manejo de massas anexiais [9]. O CA - 19.9 pode estar elevado no subtipo mucinoso, o beta-hCG pode estar aumentado nos tumores de origem germinativa e também no

**Endereço:** Rua Madre Maria José, 122

**Bairro:** Nossa Sra. Abadia

**CEP:** 38.025-100

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5776

**Fax:** (34)3318-5776

**E-mail:** cep@pesqpg.ufm.edu.br

Continuação do Parecer: 877.759

coriorcarcinoma [10]. Murta et al. (2004) demonstraram a validade da associação de ultrassonografia e marcadores tumorais na identificação de neoplasias ovarianas, melhorando a sensibilidade e a especificidade como fator preditor de malignidade e conduzindo o cirurgião ao melhor tratamento [11]. Assim, a utilização de marcadores tumorais tem validade na diferenciação de massas ovarianas benignas e malignas, além de sugerir o subtipo histológico [12].

Rossi et al. (2004) estudaram o CA 125 como fator prognóstico (estudo retrospectivo de 82 pacientes), e demonstraram que esse marcador correlacionou com o estadiamento da FIGO, mas não com a idade, o grau, a doença residual após cirurgia, e intervalo livre de doença [13]. Santillan et al. (2005) avaliaram o risco de recidiva de câncer epitelial de ovário em pacientes com níveis séricos de CA125 menor que 35m U/ml, e demonstraram que um aumento progressivo de seus valores, mesmo ainda em níveis normais, poderia ser indicativo de recorrência da doença [14]. Paramasivam et al. (2005) mostraram que o estadiamento cirúrgico completo, o grau histopatológico e os níveis pré-operatórios de CA125 são fatores prognósticos independentes e poderiam ser incluídos como fatores de decisão da realização de quimioterapia [15]. Muramatsu et al. (2005) demonstraram que na avaliação de CA 125 e CA 19.9 séricos e do diâmetro tumoral em pacientes com estágio IA e IC, houve diferenças significativas entre os estádios [16].

Uma outra alternativa em estudo é a avaliação do microambiente tumoral intracístico. CA - 15.3, CA - 125, CA - 19.9 e CEA apresentam alta positividade tanto no soro quanto no fluido intracístico de pacientes com tumores epiteliais malignos de ovário [17, 18].

Estudos mostram que outros marcadores podem ser usados nos diagnósticos das neoplasias ovarianas: HE4, GDF-15, Ca 72.4, Octamer-4, Nectin-4, progranulina. O GDF-15 atua como biomarcador de prognóstico potencialmente útil no carcinoma do ovário. O GDF-15 é induzido por citocinas inflamatórias, tais como interleucina-1 e fator de necrose tumoral. Seu aumento está associado a situações patológicas relacionadas à inflamação, lesão tecidual aguda, e malignidade [19]. O GDF-15 é membro da família TGF-beta, também chamada de citocina-1 inibidora de macrófagos (MIC-1), sendo originalmente identificado em linhagens celulares ativadas por macrófagos. O GDF-15 regula uma grande variedade de processos fisiológicos, como indução de apoptose e invasividade tumoral [20]. Concentrações elevadas também têm sido associadas a com um aumento do risco de eventos cardiovasculares em mulheres de idade avançada [21].

A progranulina é encontrada no cromossomo 17q, que pode promover a angiogênese e invasão tumoral. Pode existir uma relação entre os níveis séricos de progranulina e a sobrevida global e livre de doença em câncer epitelial de ovário [22]. Progranulina é um fator de crescimento que pode mediar a progressão do ciclo celular e a motilidade celular. Ela regula a inflamação; pode ter

Endereço: Rua Madre Maria José, 122  
Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100  
UF: MG Município: UBERABA  
Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqpg.ufm.edu.br

Continuação do Parecer: 877.759

ação anti-inflamatória, inibindo algumas ações do fator de necrose tumoral [23].

#### Citocinas

As citocinas são proteínas expressas pelo sistema imunológico determinantes na regulação da função, crescimento e diferenciação deste, apresentando funções-chave na defesa do hospedeiro. Interleucinas compõem um grande grupo das citocinas produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e células teciduais. Possuem grande variedade de funções, mas a maioria delas está envolvida na indução da divisão de outras células. As interleucinas são citocinas importantes no estudo da interação tumor-hospedeiro, possuindo propriedades pró ou antitumorais [24]. A inflamação crônica é associada a várias etapas da tumorigênese, incluindo a transformação, proliferação e invasão celular, angiogênese e metástase [25]. As citocinas podem estimular o crescimento celular e contribuir para a metástase. Se permanentemente sintetizadas, estas substâncias podem ser utilizadas como marcadores de ativação do sistema imune. A participação das citocinas na oncogênese revela suas atuações (isolada ou em conjunto com outras citocinas) em atividades imunomoduladoras da resposta imunológica contra neoplasias e, conseqüentemente, na sinalização entre células inflamatórias e o tecido neoplásico. Essa sinalização poderia inferir ou não em vantagens seletivas ao crescimento das células malignas [26,27].

Além da atividade tradicional da IL-2 na promoção do crescimento dos linfócitos T, ela também participa da ativação, crescimento e estímulo da função tumoricida das células NK [28]. Altos níveis de IL-2 significam aumento dos componentes do sistema imune no ataque contra as células cancerosas. Assim, a IL-2 é utilizada no tratamento de alguns cânceres [29,30]. A IL-6 influencia a função ovariana e no processo de ovulação, fertilização e implantação [31]. Pode estar associada à progressão tumoral através da apoptose de células malignas [32]. É relatada como fator prognóstico do câncer ovariano [33]. Produzidas por macrófagos, monócitos e linfócitos, as interleucinas 8 (IL-8) e 10 (IL-10) podem exercer vários efeitos sobre o sistema imune e estão relacionadas a angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas [34].

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, originalmente identificada como quimioatrativa de neutrófilos, esta citocina é produzida por células epiteliais, fibroblastos e tumorais, as quais também possuem receptores para esta interleucina [35]. Sua expressão em células do melanoma humano e do câncer ovariano está correlacionada ao potencial metastático do tumor [24,37,38].

**Endereço:** Rua Madre Maria José, 122

**Bairro:** Nossa Sra. Abadia

**CEP:** 38.025-100

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5776

**Fax:** (34)3318-5776

**E-mail:** cep@pesqg.ufm.edu.br

Continuação do Parecer: 877.759

A IL-10 é uma citocina multifuncional, produzidas pelos linfócitos Th2, pode inibir a resposta imune do tipo celular e as funções das células Th1 (CD4+) imunocompetentes, pelo bloqueio da função de apresentação de antígenos por estas células [39], as quais são capazes de produzir IL-8, acarretando a progressão da malignidade [34,40]. Estudo realizado por Llanes-Fernandez et al. (2009) evidenciou associação inversa entre a IL-10 e a p53, o que reflete o efeito supressor da IL-10 no microambiente do tumor, e sua associação inversa com um marcador de apoptose foi sugerido como indicativo do aumento da agressividade do tumor. Uma possível explicação para o resultado encontrado é o bloqueio da expressão de algumas citocinas pela p53, todavia a regulação negativa destas moléculas pode ser perdida quando há uma deficiência da p53 ocasionada, por exemplo, por mutações [38].

Enquanto algumas citocinas estimulam a proliferação e a invasão do câncer, outras, como os interferons, inibem este processo. O interferon gama (IFN-) é produzido principalmente pelas células Th1 CD4+, CD8+ e NK. Seu efeito antiproliferativo provavelmente é devido ao aumento da morte celular por estimular a atividade de algumas enzimas caspases e exercer atividade antiangiogênica [40] e antitumoral [33]. O TNF- além de ser um dos principais mediadores da inflamação, também é produzido por tumores. Seu papel na tumorigênese inclui transformação e proliferação celular na invasão, angiogênese e metástase [41,42].

#### Estroma em carcinoma epitelial de ovário

Um grande progresso tem ocorrido no entendimento do papel do sistema imune na progressão tumoral nos últimos anos. A presença de células mononucleares tumor-infiltrantes consiste em linfócitos T auxiliares e citotóxicas, células natural - killer, linfócitos B e macrófagos, demonstrando uma resposta imune ativa possivelmente direcionada contra os antígenos tumorais. A maioria das células T infiltrantes são linfócitos T CD8+ que poderiam mediar uma citotoxicidade específica contra células tumorais. Por outro lado, os macrófagos (células CD68) são importantes no recrutamento e ativação de linfócitos na presença desses antígenos. Porém, há uma heterogeneidade de macrófagos, podendo resultar em funções antagonistas, podendo inibir ou estimular a proliferação de células tumorais [43,44]. A presença de linfócitos-T infiltrantes (TIL) pode se correlacionar com melhor prognóstico em vários tumores, mas há resultados conflitantes da significância prognóstica de TIL em neoplasia maligna epitelial de ovário [45,46].

Na literatura, tem sido demonstrado que grande número de células T CD3+ são indicativas de uma

**Endereço:** Rua Madre Maria José, 122

**Bairro:** Nossa Sra. Abadia

**CEP:** 38.025-100

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5776

**Fax:** (34)3318-5776

**E-mail:** cep@pesqpg.ufm.edu.br

Continuação do Parecer: 877.759

melhor sobrevida em neoplasia maligna de ovário [46,47], e que os linfócitos T CD-8+ são responsáveis por esse efeito [45,48,49]. Por outro lado, a presença de linfócitos T CD4+ regulatórios parecem reduzir a imunidade específica contra tumores, resultando em pobre sobrevida [50]. A localização de TILs nos tumores tem-se mostrado por ser importante fator prognóstico em câncer de ovário [45,51].

A infiltração de células imunes peri e intratumorais podem ser fatores preditores de resposta à quimioterapia [47,49]. Bösmüller et al. (2011) mostraram que a densidade de células T CD3+ e CD8+ no estroma tumoral pode ser um fator preditor da resposta à terapia baseada em platínio [52].

Linfócitos T CD4+ regulatórios (Treg) podem induzir a uma tolerância e suprimir a resposta imune, o que é feito através da secreção de TGF- e interleucina 10 (IL-10), ou por contato direto célula-célula [50]. Os estudos demonstram uma propensão a localização dessas células na região peritumoral [53,54].

É bem estudado que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no comportamento do tumor. O estroma pode controlar o crescimento de tumores e invasão. Este compartimento tem uma grande influência relacionada com a resposta imune. A infiltração de células imunes em tumores pode até mesmo determinar a evolução e o prognóstico da doença, e a interação entre as células neoplásicas e o estroma é um fator crítico para o crescimento do tumor [55]. Por isso, o compartimento que será avaliado nesse estudo na imuno-histoquímica para TILs será o estromal.

Recentemente, estudos demonstraram que fibroblastos associados a carcinoma (CAFs) podem promover diretamente tumorigênese através de múltiplos mecanismos, incluindo a angiogênese, proliferação, invasão e supressão imune [56, 57]. Esses efeitos são mediados através da expressão e secreção de vários fatores de crescimento, como o TGF-, VEGF e interleucina-8 (IL8) [58]. Esses efeitos são também estabelecidos pela modulação e status de diferenciação de células inflamatórias no microambiente tumoral [59]. Além disso, CAFs poderiam afetar a sensibilidade das células do tumor à quimioterapia e à radioterapia [60]. FAP e SMA são considerados marcadores para CAFs em vários tipos de tumores. A eliminação de CAFs in vivo através de uma vacina de DNA cujo alvo é a proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP) resultou em uma mudança do microambiente imune do padrão Th2 para Th1, melhorando os efeitos antimetastáticos da quimioterapia com doxorrubicina em um modelo murino de câncer de mama [61]. FAP exercem um papel importante na predição da agressividade tumoral em pacientes com carcinoma epitelial de ovário após terapia neoadjuvante. CAFs podem exercer um importante papel

**Endereço:** Rua Madre Maria José, 122

**Bairro:** Nossa Sra. Abadia

**CEP:** 38.025-100

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5776

**Fax:** (34)3318-5776

**E-mail:** cep@pesqpg.ufm.edu.br

Continuação do Parecer: 877.759

também na progressão do câncer e metástases, podendo ser alvo para novas estratégias terapêuticas [62, 63].

Dessa forma, parece existir uma estreita relação entre CAFs e resposta imune tumoral, o que justifica o estudo dessa relação em neoplasias malignas epiteliais de ovário.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

1. Investigar a expressão imunohistoquímica de dois marcadores de fibroblastos associados a carcinoma (CAFs), a alfa actina de músculo liso (SMA) e a proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP), no compartimento estromal de neoplasias benignas e malignas epiteliais de ovário.
2. Investigar a expressão imunohistoquímica de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 e TNF-alfa) e de linfócitos tumor-infiltrantes - TILs (CD3, CD4 e CD8) no estroma de neoplasias benignas e malignas epiteliais de ovário.
3. Relacionar a expressão de SMA e FAP com a expressão de citocinas e TILs no estroma de neoplasias malignas de ovário e com a dosagem dessas mesmas citocinas no soro e líquido intracístico.
4. Relacionar a expressão de SMA e FAP, e a expressão de citocinas e TILs no compartimento estromal com fatores prognósticos em carcinoma epitelial de ovário.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos inerentes à pesquisa, já que os protocolos clínicos e cirúrgicos serão mantidos, o lavado peritoneal já faz parte da rotina do procedimento cirúrgico, e a punção do cisto de ovário será realizada após a exérese do mesmo, não prolongando em nada o tempo cirúrgico e nem interferindo no procedimento. O único desconforto devido à pesquisa poderá ser causado pela coleta de sangue, o que será minimizado por ser realizado por profissional habilitado e com as explicações pertinentes oferecidas às pacientes. O risco da perda de confidencialidade será prevenido pela utilização de números e/ou letras para identificação dos casos.

Os benefícios são consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico. Considerando que a avaliação clínica e os elementos utilizados para o estudo são parte do diagnóstico e condutas terapêuticas de rotina,

Endereço: Rua Madre Maria José, 122  
Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100  
UF: MG Município: UBERABA  
Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqg.ufm.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

não há riscos adicionais às pacientes referentes à pesquisa. Os benefícios são consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

pendências atendidas

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

pendências atendidas

**Recomendações:**

pendências atendidas

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

pendências atendidas

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

UBERABA, 19 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**ANA PALMIRA SOARES DOS SANTOS**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Madre Maria José, 122  
Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100  
UF: MG Município: UBERABA  
Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqpg.uftrn.edu.br

1 **ANEXO B**

2 **MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO**

3 **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO.**

4 **TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação de parâmetros da resposta inflamatória em neoplasias**  
5 **ovarianas”**

6 Eu,

7 .....

8 Registro Hospitalar nº ....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi  
9 para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi  
10 esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha  
11 participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu  
12 tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei  
13 dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo e autorizo a  
14 publicação em forma de artigo científico sobre minha doença.

15 Uberaba, ...../ ...../.....

16 \_\_\_\_\_

17 Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

18 \_\_\_\_\_

19 Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

20 Telefone de contato da paciente: \_\_\_\_\_

21 Telefone de contato dos pesquisadores: 34-3318-5326

1

## ANEXO C

2

## DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS EM IMUNOHISTOQUÍMICA NO

3

## ESTUDO

Anticorpos	Marca	Descrição	Formulação/Diluição	Controles Positivos
FAP	<b>Nova Analítica Imp e Exp LTDA</b> Nova Analítica Imp e Exp LTDA. Rua Assungui, 432, Vila Gumercindo 04131-000, São Paulo, SP, Brazil	Anti-Fibroblast activation protein, alpha antibody – ab53066	1:50	Tecido de câncer de mama humano
$\alpha$ -Actina	<b>R&amp;D Systems, Inc.</b> 614 McKinley Place NE Minneapolis, MN 55413 Toll Free USA, Canada: (800) 343-7475	Human $\alpha$ -Smooth Muscle Actin N-terminal Synthetic Decapeptide Antibody / Monoclonal Mouse IgG <sub>2A</sub> Clone # 1A4 / Lot: IBR0213121	Lyophilized from 100 $\mu$ l of a 0.2 $\mu$ m filtered solution in PBS pH 7.4 / Reconstitute at 0.5 mg/mL in sterile PBS	Tecido de coração humano / Tecido de câncer de mama humano

4