



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MEDICINA TRANSLACIONAL

SÉRGIO SANTANA OTANO

**ALTERAÇÕES DO ESTROMA E PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS
HEMATOLÓGICOS NO CÂNCER DE COLO UTERINO AVANÇADO**

UBERABA – MG
2022

SÉRGIO SANTANA OTANO

**ALTERAÇÕES DO ESTROMA E PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS
HEMATOLÓGICOS NO CÂNCER DE COLO UTERINO AVANÇADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini.

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta.

**UBERABA – MG
2022**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

O96a Otano, Sérgio Santana
Alterações do estroma e parâmetros inflamatórios hematológicos no
câncer de colo uterino avançado / Sérgio Santana Otano. – 2022.
84 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022
Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Nomelini Simões
Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

1. Neoplasias do colo do útero. 2. Actinas. 3. Fibroblastos associados a
câncer. 4. Plaquetas. 5. Neutrófilos. I. Simões, Rosekeila Nomelini. II.
Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.146-006

SÉRGIO SANTANA OTANO

**ALTERAÇÕES DO ESTROMA E PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS
HEMATOLÓGICOS NO CÂNCER DE COLO UTERINO AVANÇADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini.

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta.

16 de Dezembro de 2022.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini (Orientadora)
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Douglas Cobo Micheli
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara
Universidade de São Paulo

Dedico este estudo aos meus pais, exemplo de amor, carinho, honestidade e perseverança, maiores e melhores orientadores da vida.

À minha esposa e meus filhos, obrigado pelo apoio e incentivo. O amor que tenho por vocês me estimula a lutar e vencer todos os dias.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela oportunidade de realizar um sonho, pela presença constante em minha vida e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, Alzira e Pastor (in memoriam), pelo amor, dedicação, apoio e por sempre me incentivar nas minhas escolhas e decisões.

À **minha esposa Juliana**, pela parceria, paciência e compreensão. Sua presença foi essencial para que eu pudesse ter um caminho mais fácil e prazeroso durante esses anos.

Aos meus filhos, Nicolás e Pedro, pelo carinho, abraços, beijos, sorrisos e por compreenderem minha ausência em diversos momentos.

Aos meus irmãos, Arturo e Ana Felicita, por acreditarem nos meus objetivos.

À **minha família**, pelo apoio e incentivo.

À **minha orientadora Prof.^a Dra. Rosekeila Simões Nomelini**, pelo exemplo de dedicação a ser seguido, pela disposição em sempre me ajudar, pela paciência, pela contribuição valiosa na concepção deste estudo. Minha eterna gratidão.

Ao meu coorientador Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pela paciência, conhecimentos, competência e ensinamentos, por acreditar e confiar nesta pesquisa.

À **Prof.^a Dra. Millena Prata Jammal, Prof.^a Dra. Eliângela de Castro Côbo e Prof.^a Dra. Adilha Misson Rua Micheletti** pela enorme colaboração, auxílio e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

Aos médicos residentes de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM pelo auxílio na coleta de dados e colaboração na construção deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, André e Tuânia, pela paciência e pela disposição em me auxiliar.

À **todos do Serviço de Radioterapia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC/UFTM)**, pelo apoio, incentivo, compreensão e colaboração constante em todos os momentos em que deles eu precisei, especialmente **Daniele, Mayara, Patrícia, André, Adriano, William e Rafael**.

À **todos do Serviço de Radioterapia do Hospital Dr. Hélio Angotti**, por todo apoio e pelas trocas de aprendizados.

Aos participantes da pesquisa, pela participação, colaboração e por acreditarem no estudo.

Aos membros da banca da defesa, por aceitarem prontamente o convite e contribuírem para o aperfeiçoamento desta pesquisa.

A Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foi realizado este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), à Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (**FUNEPU**), à Associação de Apoio à Residência Médica de Minas Gerais (**AREMG**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG**), pelo apoio financeiro.

RESUMO

OBJETIVOS: Os objetivos do estudo foram comparar, no período pré-tratamento, o estroma do colo (alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos) em pacientes com câncer do colo avançado (estádio maior ou igual a IIB) com o grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina); comparar, no período pré-tratamento, parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilo-linfócito – RNL, relação plaqueta-linfócito – RPL, RDW) em pacientes com câncer do colo avançado (estádio maior ou igual a IIB) com os mesmos parâmetros do grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina); e em câncer do colo, verificar se há associação da imunomarcção dos marcadores do estroma com fatores prognósticos patológicos (tipo histológico, grau histológico e grau de diferenciação) e sistêmicos (plaquetas, RNL, RPL e RDW).

MÉTODOS: Foram avaliadas prospectivamente 16 pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo do colo uterino estadiamento avançado (maior ou igual a IIB), confirmados por biópsia. Foram anotados do prontuário dados clínicos, citologia oncótica, parâmetros do hemograma (neutrófilos, linfócitos, plaquetas, RDW) e biópsia em banco de dados específico para o estudo. Um grupo controle de 22 pacientes foi utilizado (pacientes submetidas a histerectomia por mioma). Foi realizado imuno-histoquímica para verificar a imunomarcção estromal de alfa-actina de músculo liso (SMA) e proteína alfa de ativação de fibroblastos (FAP) em biópsia de colo de pacientes do grupo de estudo e do grupo controle. As imunomarcções dos marcadores de estroma foram comparadas entre os grupos através do teste exato de Fisher. Os resultados dos parâmetros de hemograma foram comparados entre os grupos através de Teste Mann-Whitney. As diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS: A imunomarcção forte (2/3) por FAP foi mais frequente em pacientes com câncer do colo uterino quando comparado com pacientes com mioma (grupo controle) ($p=0.0005$). Em relação a SMA, a imunomarcção forte (2/3) também foi mais encontrada no grupo de pacientes com câncer comparado ao grupo de pacientes com mioma ($p < 0.00001$). Os valores de RNL foram mais elevados no grupo de pacientes com câncer comparado com o grupo controle ($p=0,0019$). Em relação aos valores de RPL, esses foram também mais altos no grupo câncer que no grupo de leiomioma, mas no limiar de significância ($p=0.0675$). Não houve diferença significativa na avaliação dos 2 marcadores de estroma em câncer do colo uterino no estudo de fatores prognósticos patológicos (estadiamento e grau histológico) e nem no estudo de fatores sistêmicos.

CONCLUSÃO: A imunomarcção forte (2/3) por FAP e SMA foram mais encontradas no grupo de pacientes

com câncer do colo uterino quando comparado com o grupo de pacientes com mioma. Os valores de RNL foram mais elevados no grupo de pacientes com câncer quando comparado com o grupo controle.

Palavras-chave: Câncer do colo uterino. Alfa-actina de músculo liso. Proteína alfa de ativação de fibroblastos. Estroma. Parâmetros do hemograma.

ABSTRACT

OBJECTIVES: The objectives of the study were to compare the cervical stroma in patients with advanced cervical cancer with the control group; to compare, in the pre-treatment period, blood count parameters (platelets, neutrophil-lymphocyte ratio - NLR, platelet-lymphocyte ratio - PLR, RDW) in patients with advanced cervical cancer (stage \geq IIB) with the same parameters as control group; and in cervical cancer, to verify if there is an association of immunostaining of stromal markers with pathological and systemic prognostic factors.

METHODS: We prospectively evaluated 16 patients diagnosed with advanced invasive cervical cancer (stage \geq IIB), confirmed by biopsy. A control group of 22 patients was used (patients undergoing hysterectomy for uterine leiomyoma). Immunohistochemistry was performed to verify the stromal immunostaining of SMA (alpha-smooth muscle actin) and FAP (fibroblast activation protein alpha) in cervical biopsy of patients and the control group. Immunostainings were compared between groups using Fisher's exact test. The results of the hemogram parameters were compared using the Mann-Whitney Test. Differences were considered significant for $p < 0.05$. **RESULTS:** Strong FAP immunostaining (2/3) was more frequent in patients with cervical cancer when compared with patients with myoma ($p=0.0005$). Regarding SMA, strong immunostaining (2/3) was also found more in the group of cancer patients compared to the group of patients with myoma ($p < 0.00001$). The NLR values were higher in the cancer patient group compared to the control group ($p=0.0019$). Regarding the PLR values, these were also higher in the cancer group than in the leiomyoma group, but at the threshold of significance ($p=0.0675$). There was no significant difference in the evaluation of the two stromal markers in cervical cancer in the study of pathological prognostic factors (staging and histological grade) nor in the study of systemic factors. **CONCLUSION:** Strong FAP and SMA immunostaining (2/3) were found more in the group of patients with cervical cancer when compared to the control group. The NLR values were also higher in the group of cancer patients.

Keywords: Cervical cancer. Alpha-smooth muscle actin. Fibroblast activation protein alpha. Stroma. Blood count parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Fotomicrografia de biópsia do colo uterino com carcinoma epidermóide invasor bem diferenciado (40x)..... | 25 |
| Figura 2 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares positivas para actina de músculo liso 3+/3 (40x)..... | 25 |
| Figura 3 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos positivos para fator anti-fibroblastos 3+/3 (40x)..... | 26 |
| Figura 4 - Fotomicrografia de biópsia do colo uterino com carcinoma epidermóide invasor moderadamente diferenciado (40x)..... | 26 |
| Figura 5 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares positivas para actina de músculo liso 2+/3 (40x)..... | 27 |
| Figura 6 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos positivos para fator anti-fibroblastos 3+/3 (40x)..... | 27 |
| Figura 7 - Fotomicrografia de biópsia do colo uterino com leve cervicite inespecífica (20x)..... | 28 |
| Figura 8 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares e pequenos capilares positivos para actina de músculo liso 1+/3 (40x)..... | 28 |
| Figura 9 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos e pequenos capilares positivos para fator anti-fibroblastos 2+/3 (anti-FAP, 40x)..... | 29 |
| Figura 10 - Fotomicrografia de biópsia do colo uterino demonstrando o estroma com pequenos capilares sem alterações (20x)..... | 29 |
| Figura 11 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares e capilares positivos para actina de músculo liso 2+/3 (40x)..... | 30 |
| Figura 12 - Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos e capilares positivos para fator anti-fibroblastos 1+/3 (40x)..... | 30 |
| Figura 13 - Relação neutrófilo-linfócito em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas..... | 35 |
| Figura 14 - Relação plaqueta-linfócito em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas..... | 35 |
| Figura 15 - Valor absoluto de plaquetas (/mm ³) em pacientes com câncer do colo uterino | |

| | |
|---|----|
| e leiomiomas..... | 36 |
| Figura 16 - RDW em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características gerais e parâmetros do hemograma dos grupos de pacientes com câncer do colo uterino e mioma uterino atendidas no Hospital de Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, 2020-2022..... | 32 |
| Tabela 2 - Características do grupo de pacientes com câncer do colo uterino atendidas no Hospital de Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, 2020-2022, quanto ao tipo histológico, grau histológico e estadiamento..... | 33 |
| Tabela 3 - Imunomarcção da Proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP) em câncer de colo uterino e mioma uterino, Uberaba-MG, 2020-2022..... | 34 |
| Tabela 4 - Imunomarcção da alfa-actina de músculo liso (SMA) em câncer do colo uterino e mioma uterino, Uberaba-MG, 2020-2022..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - Célula apresentadora de antígeno
APCs – Células apresentadoras de antígenos
AREMG - Associação de Apoio à Residência Médica de Minas Gerais
ATP – Trifosfato de adenosina
ATPS – Trifosfatos de adenosina
BSA – Albumina soro bovino
CAFs - Fibroblastos associados ao câncer
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDI – Morte celular imunogênica
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
c-FLIP – Proteína celular inibitória semelhante a FLICE
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRT - Calreticulina
CTLs - Linfócitos T citotóxicos
DAB – Corante Diaminobenzidina
DAMPs – Padrões moleculares associados a dano
DC – Células dendríticas
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EUA - Estados Unidos da América
FAP - Proteína alfa de ativação de fibroblastos
FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FasL - Expressão do ligante Fas
FUNEPU - Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba
HC/UFTM - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
HE - Hematoxilina e eosina
HMGB1 – Proteína de alta mobilidade box 1
ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular
IL - Interleucina
MDSCs - Células supressoras derivadas de células mielóides
MEC - Matriz extracelular
MHC-I – Complexo maior histocompatibilidade
PBS – Tampão fosfato

PCR - Reação em cadeia da Polimerase
RDW - Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos
RNL - Relação neutrófilo-linfócito
RPL - Relação plaqueta-linfócito
RXT - Radioterapia
SBRT - Terapia de radiação estereotáxica do corpo
SMA - Alfa-actina de músculo liso
TAMs - Macrófagos associados a tumores
TGF- β - Fator transformador de crescimento
TME – Microambiente tumoral
Tregs - Células T reguladoras
UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VCAM-1 - Proteína de adesão vascular
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 O ESTROMA..... | 16 |
| 1.2 IMUNIDADE ANTITUMORAL | 19 |
| 1.3 MECANISMOS IMUNOGÊNICOS DE RXT | 21 |
| 1.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS..... | 22 |
| 1.5 JUSTIFICATIVA..... | 23 |
| 1.6 HIPÓTESE..... | 23 |
| 2 OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 23 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 COLETA DA BIÓPSIA DO COLO | 25 |
| 3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 25 |
| 3.3 CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO..... | 32 |
| 3.4 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA..... | 32 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 32 |
| 4 RESULTADOS | 33 |
| 5 DISCUSSÃO | 38 |
| 6 CONCLUSÃO | 42 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |
| ANEXO A – Parecer substanciado do CEP | 48 |
| APÊNDICE A – Termo de Consentimento | 63 |
| APÊNDICE B – Termo de Consentimento | 66 |
| APÊNDICE C – Descrição dos Anticorpos | 69 |
| APÊNDICE D – Artigo Submetido | 70 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as quatro principais causas de morte prematura na maior parte dos países. A incidência e a mortalidade por esta doença vêm aumentando, devido ao envelhecimento, ao crescimento populacional, como também pelas alterações na distribuição e na prevalência dos fatores de risco, especialmente aqueles associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY et al., 2018).

Ocorreram no mundo, em 2018, 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. O tipo mais incidente no mundo foi o câncer de pulmão (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). A incidência em homens representa 53% dos casos novos, sendo um pouco maior nas mulheres (47%) de casos novos. Os tipos mais frequentes nos homens foram o câncer de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). Nas mulheres, as maiores incidências foram câncer de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre mulheres. Para o ano de 2022 foram estimados 16.710 casos novos, o que representa um risco considerado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2022). Na análise regional, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na região Norte (26,24/100 mil) e o segundo nas regiões Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil). Já na região Sul (12,60/100 mil) ocupa a quarta posição e, na região Sudeste (8,61/100 mil), a quinta posição (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Na mortalidade proporcional por câncer em mulheres, em 2020, os óbitos por câncer do colo do útero ocupam o terceiro lugar no país, representando 6,1% do total (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2022).

1.1 O ESTROMA

O estroma tumoral é constituído por várias células, e a matriz extracelular (MEC) que demonstraram ajudar a suprimir as respostas imunitárias do hospedeiro contra as células

tumorais. Através da secreção de citocinas imunossupressoras, alterações metabólicas e outros mecanismos, o estroma tumoral fornece uma rede complexa de salvaguardas para a proliferação tumoral (MENON et al., 2019).

Os tipos histológicos mais frequentes de câncer de colo de útero são os carcinomas escamosos, compostos por células relativamente grandes que podem se dividir em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e mal diferenciado. Esses tumores estão frequentemente associados ao Papilomavírus humano (HPV) de alto risco, o tipo 18. E os menos frequentes que correspondem de 10% a 25% são os adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas indiferenciados ou outros tipos histológicos raros (ROBBINS, COTRAN, 2004).

O principal tratamento do câncer do colo uterino avançado é a quimiorradioterapia. Com os recentes avanços no tratamento localizado mais eficaz, a Radioterapia (RXT) permitiu estratégias que podem efetivamente alterar e remover o tecido estromal do tumor. Isto inclui a promoção de morte celular imunogênica através da liberação de antígeno tumoral para aumentar o tráfego de células imunológicas, a RXT tem uma vantagem única contra os mecanismos de evasão imunológica tumoral que são orquestrados pelas células estromais. Estudos atuais estão em andamento para elucidar vias dentro do estroma tumoral como potenciais alvos para imunoterapia e quimiorradiação. Os efeitos do estroma tumoral na evasão imune do tumor, como a RXT pode ajudar a superar esses efeitos, com possíveis abordagens combinatórias para futuras modalidades de tratamento serão explicados abaixo (MENON et al., 2019).

A radioterapia é um padrão ouro no tratamento do câncer, com mais de 50% dos pacientes com câncer precisando de terapia local com esse tratamento. Com o crescente conhecimento do papel do microambiente do tumor na evasão imune, o interesse no efeito da RXT no microambiente do tumor está crescendo. Desde o aumento da apresentação do antígeno do tumor até a facilitação do tráfego de células T, a RXT desempenha um importante papel imunogênico no tratamento do câncer e do seu microambiente (DELANEY et al., 2005).

No estroma, tanto as células tumorais quanto os abundantes M2 secretam várias moléculas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a interleucina (IL) -10, o fator transformador de crescimento (TGF)- β , a adenosina e a prostaglandina E2, que inibem a ativação de células dendríticas (DC) e maturação e suprimir a atividade de linfócitos T citotóxicos (CTLs) e imunidade mediada por células natural killer (LANITIS et al., 2017).

Da mesma forma, a secreção de prostaglandina E2 modula a produção de quimiocinas em favor da diferenciação de células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de células mielóides (MDSCs), inibindo linfócitos T citotóxicos (CTLs) e populações de células natural killer e diminui a produção de IL-2 e IL-12 (KALINSKI, 2012) macrófagos associados a tumores (TAMs) têm papéis imunossupressores que se estendem além da produção de fatores solúveis. O fenótipo "imunoecluído" pode ocorrer fisicamente por meio de interações duradouras entre CTLs e TAMs. Os macrófagos estromais impedem que as células T CD8+ atinjam as ilhotas tumorais, estabelecendo contatos duradouros que reduzem a motilidade das células T (PERANZONI et al., 2018).

A vascularização tumoral pode desempenhar um papel importante nos mecanismos estromais da exclusão imune. A migração de células T através do endotélio, que muitas vezes é desregulada como resultado do remodelamento da vasculatura, é outro desafio para a imunidade antitumoral. Para as células T migrarem para o leito tumoral, elas devem aderir ao endotélio (BUTCHER et al., 1996). Entretanto, a expressão de várias moléculas de adesão endotelial, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e a proteína de adesão vascular (VCAM) -1, é regulada negativamente em células endoteliais circundando tumores sólidos (GRIFFIOEN et al., 1996).

Motz et al. (2014) descreveram um mecanismo pelo qual a barreira endotelial do tumor regula a migração de células T para tumores. Na vasculatura de tumores humanos e de camundongos, a expressão do ligante Fas (FasL), que induz a apoptose, foi detectada, mas não foi detectada na vasculatura normal. Além disso, a expressão de FasL no endotélio foi associada à menor infiltração de CD8 + e acúmulo de Tregs, que foram resistentes ao FasL devido à maior expressão de proteína celular inibitória semelhante a FLICE (c-FLIP). No entanto, este enfraquecimento da infiltração de células T CD8 + foi revertido por inibição farmacológica de prostaglandina E2 e VEGF, que demonstraram cooperativamente induzir a express de FasL nesta barreira de morte endotelial do tumor (MOTZ et al., 2014).

A arquitetura densa da matriz do estroma também apresenta um desafio único à infiltração de células T, e a redução da matriz com colagenase mostrou melhorar a infiltração de células T (SALMON et al., 2012; BOUGHERARA et al., 2015). Finalmente, os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no estroma têm papéis pleiotrópicos na secreção de quimiocinas, citocinas e metabólitos que alteram a imunidade antitumoral (ZIANI, CHOUAIB e THIERY, 2018). Estratégias moleculares para normalizar a vasculatura tumoral e induzir estruturas linfóides terciárias têm se mostrado muito promissoras na orquestração da imunoterapia de células T eficaz de forma pré-clínica (ZIANI, CHOUAIB e THIERY, 2018;

HAMZAH et al., 2008; JOHANSSON, HAMZAH e GANSS, 2016). Em geral, as células tumorais empregam uma combinação desses mecanismos acima, excluindo as células T citotóxicas do microambiente tumoral, diminuindo a imunidade antitumoral.

1.2 IMUNIDADE ANTITUMORAL

Estudos demonstram que o crescimento tumoral não é determinado apenas pela presença de células malignas. As interações entre as células cancerígenas e o microambiente estromal têm grande impacto no crescimento e progressão do câncer. Esse microambiente é uma mistura de células hematopoiéticas e mesenquimais, que suprime o controle imunológico do crescimento tumoral. O crescimento de uma neoplasia epitelial necessita da formação de um estroma tumoral de suporte para suprir nutrientes, favorecendo o crescimento e desenvolvimento das células tumorais continuamente. Tal crescimento invasivo está associado às alterações características no estroma de apoio que incluem a indução da formação de vasos sanguíneos; o recrutamento de fibroblastos estromais reativos, linfócitos e macrófagos; a liberação de moléculas de sinalização de peptídeos; e a produção de uma matriz extracelular alterada (LEBEAU et al., 2009).

O compartimento estromal representa um componente importante da massa da maioria dos carcinomas, com 20% a 50% encontrados em cânceres de mama, pulmão e colorretal; e atingindo > 90% em carcinomas que têm reações desmoplásticas (LEBEAU et al., 2009).

Os fibroblastos associados ao câncer desempenham um papel importante nesse processo. Dois marcadores de fibroblastos associados às neoplasias – alfa-actina de músculo liso (SMA) e a proteína-alfa de ativação de fibroblasto (FAP), no microambiente estromal de neoplasias epiteliais; sendo a FAP não expressa em tecidos normais. Em tecidos não malignos, a FAP é expressa por fibroblastos reativos na cicatrização de feridas, artrite reumatoide, cirrose hepática e em alguns tecidos mesenquimais fetais. Em estudo publicado foi usado Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real para quantificar a expressão genética a partir do laser e capturar o endotélio do tumor dissecado, assim encontrando um aumento significativo na expressão da FAP, em comparação com o endotélio normal (GHILARDI et al., 2008).

FAP foi relatado originalmente como sendo um antígeno de superfície celular reconhecido pelo anticorpo monoclonal F19 em linhas humanas Astrócitos e células de sarcoma *in vitro*. Em uma série usando tecidos humanos, a FAP foi detectada no estroma de mais de 90% dos tumores malignos de mama, colorretal, pele e pâncreas. Os fibroblastos

tumorais reativos diferem dos fibroblastos dos tecidos adultos normais segundo a morfologia, expressão gênica e produção de importantes mediadores biológicos, tais como fator de crescimento e peptidases. Através de estudo comparativo, Kobayashi et al. (1993) consideraram a α -SMA um potencial marcador histopatológico útil para indicar o teor maligno de tumores ovarianos, sendo encontrado nas paredes dos vasos sanguíneos, fibras musculares e células estromais em tumores benignos expressaram o α -SMA. Entretanto, nos tecidos tumorais malignos, os vasos localizados dentro ou perto do aglomerado de células cancerosas, não expressaram α -SMA.

O campo da biologia da radiação enfocou historicamente os efeitos da radiação em matar células cancerosas isoladamente. Embora os primeiros experimentos de radiobiologia celular tenham produzido avanços significativos no entendimento do dano e reparo do DNA, eles não levaram em conta o impacto que os fatores locais e sistêmicos podem ter nas respostas de radiação. Ensaio clonogênicos e de formação de colônias in vitro, nos quais as curvas de mortalidade por log de radiação foram geradas pela primeira vez, mas não incluíram a compreensão do microambiente estromal e da imunidade (THAMES, WITHERS, 1980). Assim, esses modelos clássicos nos quais os radio-oncologistas se basearam durante décadas foram insuficientes para elucidar fenômenos como a resposta abscopal (STEEL, COURTENAY, PECKHAM, 1983; HINIKER, CHEN, KNOX, 2012).

Evidências crescentes têm implicado o microambiente estromal como sendo um mediador crítico de respostas de radiação tanto local quanto sistemicamente. A radiação é um potente indutor de lesão vascular, inflamação e fibrose. Além disso, a hipóxia e a ativação da sinalização do fator 1α / VEGF induzida por hipóxia como resultado de disfunção vascular induzida por radiação podem promover a radiorresistência. Além disso, a irradiação coloca em movimento uma resposta inflamatória e fibrótica robusta no estroma mediada por citocinas, como IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β , que podem modificar as respostas tumorais à RXT e à quimioterapia. De fato, a radiação tem uma miríade de efeitos pleiotrópicos em tumores e seu estroma que só começam a ser compreendidos (BARKER et al., 2015; VALKENBURG et al., 2018).

Com o crescente reconhecimento do papel fundamental desempenhado pela sinalização imune estromal na manutenção e radiorresistência do tumor, a busca de estratégias baseadas em mecanismos para superar a resistência à RXT baseada em uma compreensão abrangente não apenas da biologia do tumor, mas também da imunobiologia estromal e sistêmica local é crucial. Historicamente, a RXT foi considerada primariamente imunossupressora. No entanto, a descoberta do efeito abscopal em vários tipos de tumores

(embora raros) alterou significativamente nossa compreensão do papel do RXT no sistema imunológico. Este novo paradigma demonstra que a RXT é uma ferramenta imunomoduladora que facilita o recrutamento e ativação do sistema imunológico para combater tumores. A principal base do efeito da RXT na imunidade antitumoral é aumentar a liberação de antígenos tumorais e sua disponibilidade para células apresentadoras de antígenos (APCs) para tomar e primar células T. No entanto, RXT também tem efeitos diretos sobre o estroma circundante que permite que o sistema imunológico aumente as respostas antitumorais (MENON et al., 2019).

1.3 MECANISMOS IMUNOGÊNICOS DE RXT

Como descrito anteriormente, a RXT foi inicialmente utilizada para induzir diretamente os danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), levando à morte das células tumorais (ANTONIA et al., 2018). Historicamente, esse mecanismo de morte por DNA foi visto como imunossupressivo devido à radiosensibilidade dos linfócitos (TROWELL et al., 1952). No entanto, com os recentes avanços na tecnologia, incluindo a terapia de radiação estereotáxica do corpo (SBRT), que permite distribuições mais apertadas e doses mais altas, tem havido evidências crescentes de que a RXT pode ajudar a ativar células T e destruir grande parte do estroma inibitório imunológico (MENON et al., 2019).

Um resultado direto relacionado à imunidade da RXT é a liberação de antígenos tumorais, o que permite a apresentação de APC e subsequente ativação de células CD8⁺. Esta modalidade de morte celular é denominada morte celular imunogênica (CDI). Tradicionalmente, a apoptose é considerada um processo tolerogênico, que limita a capacidade do sistema imunológico de desenvolver uma resposta completa. No entanto, com o CDI, uma fonte externa de estresse facilita a liberação de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), que induzem um sinal para as APCs e instigam a morte celular. Diversos DAMPs foram implicados na via do CDI, como calreticulina (CRT), proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1) e trifosfato de adenosina (ATP) secretado (KEPP, SENOVILLA, KROEMER, 2014; HERNANDEZ, HUEBENER, SCHWABE, 2016; WU et al., 2017).

Mesmo com o aumento da liberação de antígeno devido a RXT levando ao aumento do CDI, o microambiente tumoral (TME) não permite a ativação adequada da resposta imune. Por exemplo, os tumores demonstraram expressão de complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I), que leva à diminuição do reconhecimento de células tumorais pelas células T efetoras. Clinicamente, o aumento da expressão de MHC-I tem sido associado

à melhora da sobrevida de múltiplos tipos de câncer (TURCOTTE et al., 2014, GOEPPERT et al., 2015). Biologicamente, isso faz sentido, pois pode ocorrer um aumento no número de reações mediadas por células T, conferindo respostas imunológicas mais fortes. A expressão reduzida de MHC-1, biologicamente é encontrada no estroma do tumor e pode ser superada por RXT (MENON et al., 2019).

1.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Uma boa definição de hemograma seria o conjunto de avaliações das células do sangue (quantitativas e qualitativas) que, reunido aos dados clínicos permite conclusões diagnósticas e prognósticas de grande número de patologias (FAILACE et al., 2009). O hemograma é um dos exames mais solicitados, sendo considerado um exame rápido, de baixo custo, minimamente invasivo e que causa pouco desconforto ao paciente, possuindo grande importância no conjunto de dados a serem observados no diagnóstico médico, controle evolutivo de doenças crônicas e infecciosas; assim como acompanhamento de quimioterapia e radioterapia (GUIMARÃES et al., 2011; FAILACE et al., 2009).

Estudos realizados em oncologia apontam que células do sistema sanguíneo, como leucócitos, neutrófilos e plaquetas, bem como a razão entre elas, poderiam estar ligadas à formação e crescimento de cânceres. Algumas destas células poderiam estar atuando de forma pró ou anticancerígena. Dados levantados através de pesquisas, visando avaliar as células sanguíneas consideradas imunoinflamatórias, como biomarcadores em diversos tipos de cânceres; podendo avaliar possíveis potencialidades no rastreio, diagnóstico, planejamento e monitoração terapêutica, e determinação prognóstica em pacientes (FIGUEIREDO, 2019).

A contagem de plaquetas é um parâmetro associado ao prognóstico do tumor. A trombocitose é encontrada com frequência nos pacientes oncológicos, tendo relação com uma diversidade de tumores, podendo demonstrar estágio avançado da doença. Portanto, as plaquetas exercem um papel importante no crescimento e progressão do tumor (NOMELINI et al., 2019; MANTOANI, NOMELINI e MURTA, 2021).

A relação determinada entre a quantidade de neutrófilos e linfócitos (RNL) no sangue periférico foi utilizada como um marcador de resposta inflamatória. Assim, valores altos de RNL sugerem sintomas avançados, tumores agressivos e pior sobrevida global (MANTOANI, NOMELINI e MURTA, 2021; DA SILVA et al., 2022).

Outro marcador que seu valor aumentado aponta pior evolução clínica é o RPL (razão plaqueta-linfócito), que pode prever metástases linfonodais em pacientes com câncer

cervical. Sendo assim, a avaliação conjunta de RNL e RPL permitem a previsão de sobrevivência dos pacientes (DE LIMA et al., 2021).

O RDW (amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos) é outro marcador disponível no hemograma, porém menos estudado, mas também utilizado como fator prognóstico nas pacientes com câncer (DE LIMA et al., 2021).

1.5 JUSTIFICATIVA

Esse estudo se justifica porque o estudo de parâmetros locais (estroma tumoral) e sistêmicos (parâmetros do hemograma) podem levar a novas descobertas de fatores prognósticos e preditivos de resposta no tratamento do câncer do colo uterino, que tem uma grande importância epidemiológica na saúde da mulher.

1.6 HIPÓTESE

A imunomarcção de marcadores de estroma (FAP e SMA) é mais forte em neoplasia maligna do colo uterino quando comparado com colo sem alterações, e em neoplasias malignas, imunomarcção forte desses marcadores está relacionado a fatores de pior prognóstico. Além disso, plaquetas, RNL, RPL e RDW possuem valores mais elevados em câncer cervical uterino quando comparado com pacientes sem alterações em colo uterino, demonstrando uma resposta sistêmica inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estroma (SMA e FAP) e os parâmetros do hemograma (plaquetas, RNL, RPL e RDW) em pacientes com câncer de colo uterino com estadiamento maior ou igual a IIB.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar, no período pré-tratamento, o estroma do colo (SMA e FAP) em pacientes com câncer do colo avançado (estádio maior ou igual a IIB) com o grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina).

2. Comparar, no período pré-tratamento, parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilo-linfócito – RNL, relação plaqueta-linfócito – RPL, RDW) em pacientes com câncer do colo avançado (estádio maior ou igual a IIB) com os mesmos parâmetros do grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina).

3. Em câncer do colo, verificar se há associação da imunomarcção dos marcadores do estroma com fatores prognósticos patológicos (tipo histológico, grau histológico e grau de diferenciação) e sistêmicos (plaquetas, RNL, RPL e RDW).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de coorte transversal, onde foram avaliadas prospectivamente 16 pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo do colo uterino estadiamento avançado (maior ou igual a IIB - FIGO) (BHATLA et al., 2018), confirmados por biópsia atendidas nos ambulatórios de Colposcopia e Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFTM, de 2020 a 2022. Foram anotados do prontuário dados clínicos, citologia oncótica, parâmetros do hemograma (neutrófilos, linfócitos, plaquetas, RDW) e biópsia em banco de dados específico para o estudo. Um grupo controle de 22 pacientes foi utilizado.

O critério de inclusão foi paciente com diagnóstico de câncer invasivo do colo uterino avançado (estadiamento maior ou igual a IIB).

Os critérios de exclusão foram gestação, outras doenças que levem a imunodepressão, uso de drogas imunossupressoras e recidiva.

Os dados foram obtidos dos prontuários das pacientes. Todas as pacientes com citologia oncótica mostrando carcinoma invasivo do colo uterino foram submetidas a biópsia do colo. Foi realizada a coleta de fragmentos com a pinça de biópsia Professor Medina. O estadiamento foi realizado através de exames clínicos e de imagem. As pacientes com estadiamento maior ou igual a IIB foi selecionada para o estudo. O grupo controle foi constituído de 22 pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina, sem alterações (neoplasia ou displasia) na citologia oncótica anterior à cirurgia e sem comprometimento cervical pelo mioma.

Para cálculo da relação RNL, foi realizado a divisão do número absoluto de neutrófilos pelo número absoluto de linfócitos. Para cálculo da RPL, foi realizado a divisão do número absoluto de plaquetas pelo número absoluto de linfócitos.

Foi realizado imuno-histoquímica para verificar a imunomarcção estromal de SMA e FAP em biópsia do colo de pacientes submetidas a histerectomia por mioma (grupo controle).

3.1 COLETA DA BIÓPSIA DO COLO

As biópsias do colo foram colocadas em formaldeído e encaminhadas à Disciplina de Patologia Especial. A coleta de biópsia já faz parte do procedimento de rotina para o grupo de pacientes com câncer do colo. Para o grupo-controle, a biópsia foi realizada logo após a retirada da peça cirúrgica – útero, respeitando questões éticas e evitando desconforto para a paciente (já que não é necessária biópsia do colo em pacientes com mioma uterino).

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras obtidas por ressecção cirúrgica foram processadas em parafina e revisadas por um patologista experiente. Os casos selecionados foram submetidos a novos cortes (4 µm) em lâminas silanizadas (ATPS - Silane, Sigma® A3648), pela técnica de estreptoavidina-biotina-peroxidase. As lâminas permaneceram em estufa (56°C, 24 h) e em seguida foram desparafinizadas (3 banhos em xilol, 5 min cada) e desidratadas (3 banhos em álcool absoluto e 1 banho em álcool 80%, 10 s cada). Em seguida, as lâminas permaneceram em banho (Tampão fosfato - PBS, pH 7,2, 5 min) para hidratação. O excesso de tampão foi removido e a borda cortada foi borrada com papel absorvente. Peróxido de hidrogênio (3%, 10 min) foi adicionado às lâminas sobre cada corte para bloquear a peroxidase endógena e depois lavado em PBS.

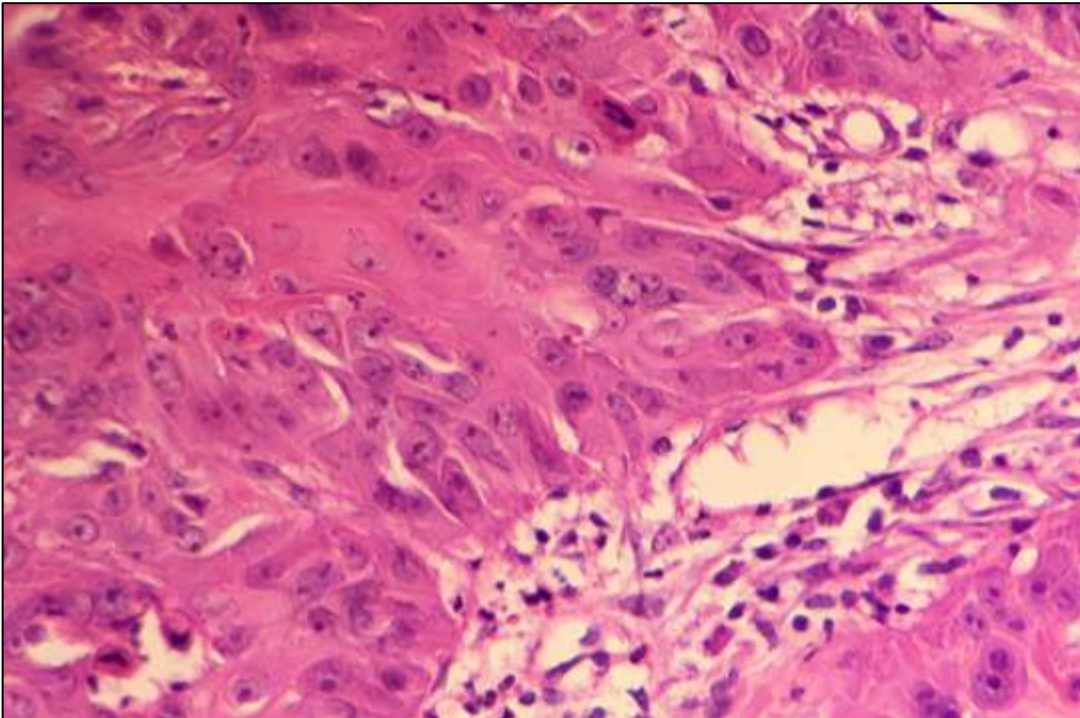
Para a recuperação do antígeno, as lâminas foram colocadas em tubos contendo solução tampão citrato 10 mM (pH 6,0) ou Tris-EDTA. Os tubos foram então colocados em um pote cheio de água destilada a 100°C até o limite indicado. Após 30 min, os tubos foram colocados em uma bancada para resfriar até a temperatura ambiente (22°C).

A coloração imuno-histoquímica foi realizada com o Novolink™ Polymer Detection System (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, EUA). Resumidamente, as lâminas foram primeiro lavadas com água destilada e secas cuidadosamente para evitar que os cortes secassem completamente. As lâminas foram então incubadas com Peroxidase Block (3% de peróxido de hidrogênio) por 5 min e lavadas 3x em tampão PBS (5 min cada). Após uma etapa de incubação de 5 min com Protein Block, as lâminas foram lavadas 3x em tampão PBS (5 min cada) e depois incubadas com o anticorpo primário específico (anti-αSMA, anti-FAP) que foram diluídos em 2% de albumina de soro bovino (Albumina soro bovino - BSA, Sigma®) de acordo com as indicações do fabricante.

As colorações foram realizadas em câmara úmida a 4°C por períodos recomendados pelo fabricante. Além disso, a coloração dos controles positivos foi realizada para cada anticorpo, de acordo com as instruções do fabricante. Depois que as lâminas foram lavadas com tampão PBS (5 min cada), as lâminas foram incubadas com Post Primary Block por 30 min, lavadas com tampão PBS (5 min cada), depois incubadas com Novolink™ Polymer. Após 30 min, as lâminas foram lavadas com tampão PBS (5 min cada) e reveladas com DAB Chromogen e Novolink corante diaminobenzidima (DAB) Substrate Buffer (Polymer). Após 5 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas em hematoxilina de Harris. Como etapa final, as lâminas foram imersas em três banhos de álcool absoluto (10 segundos cada), para retirada do excesso de água; um banho de xilol fenilado; e três banhos de xilol (5 min cada).

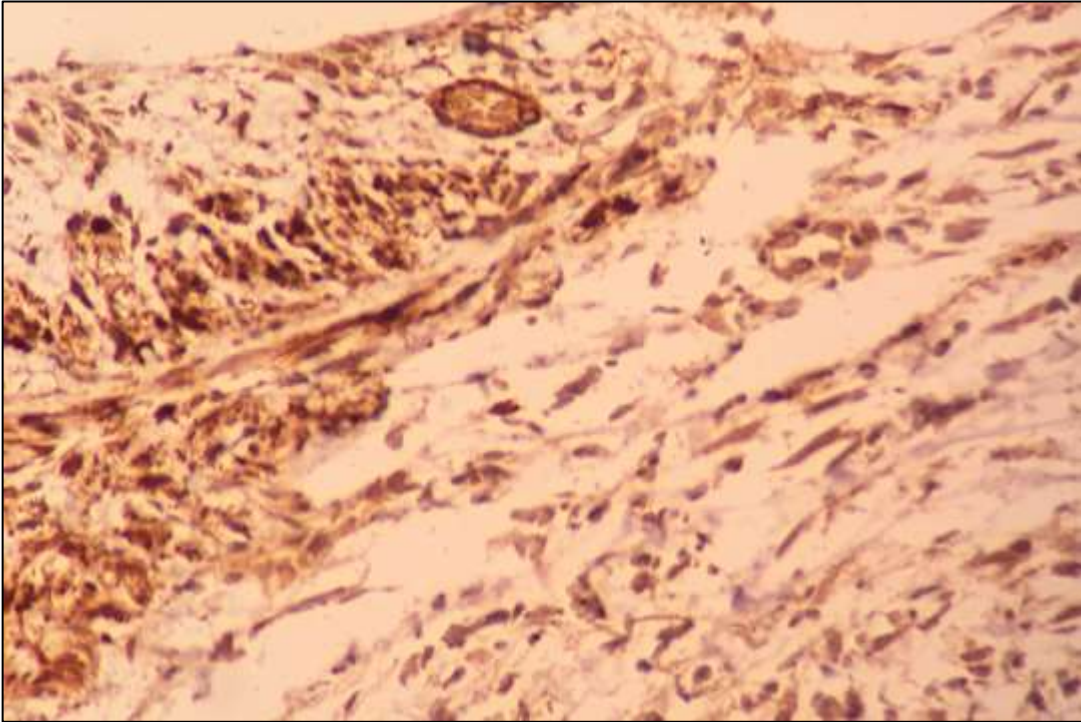
Uma lamínula foi montada em cada lâmina com Entellan (-) e dois observadores avaliaram as lâminas. A intensidade da imunocoloração no estroma foi avaliada subjetivamente usando 0 a 3: 0 (sem coloração), 1 (coloração fraca), 2 (coloração moderada), 3 (coloração forte). A Figura 1 mostra a imunocoloração dos casos (figuras 1 a 6) e controles (figuras 7 a 12).

Figura 1 – Fotomicrografia de biópsia do colo uterino com carcinoma epidermóide invasor bem diferenciado (HE, 40x).



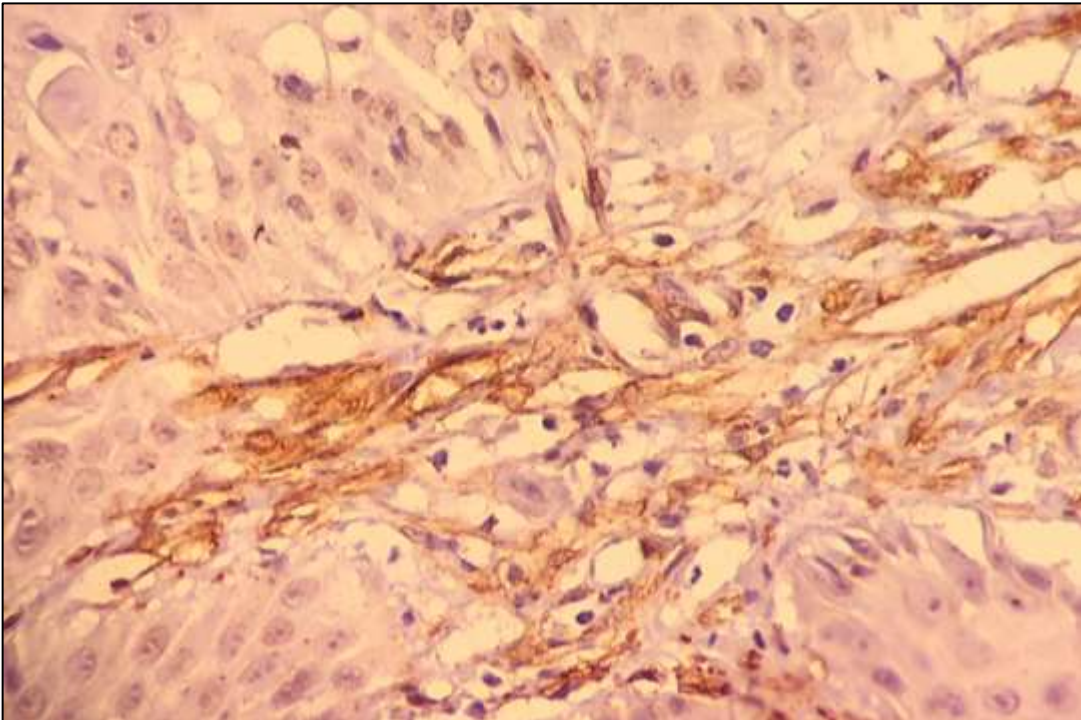
Fonte: Do autor, 2022

Figura 2 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibra musculares positivas para actina de músculo liso 3+/3 (SMA, 40x).



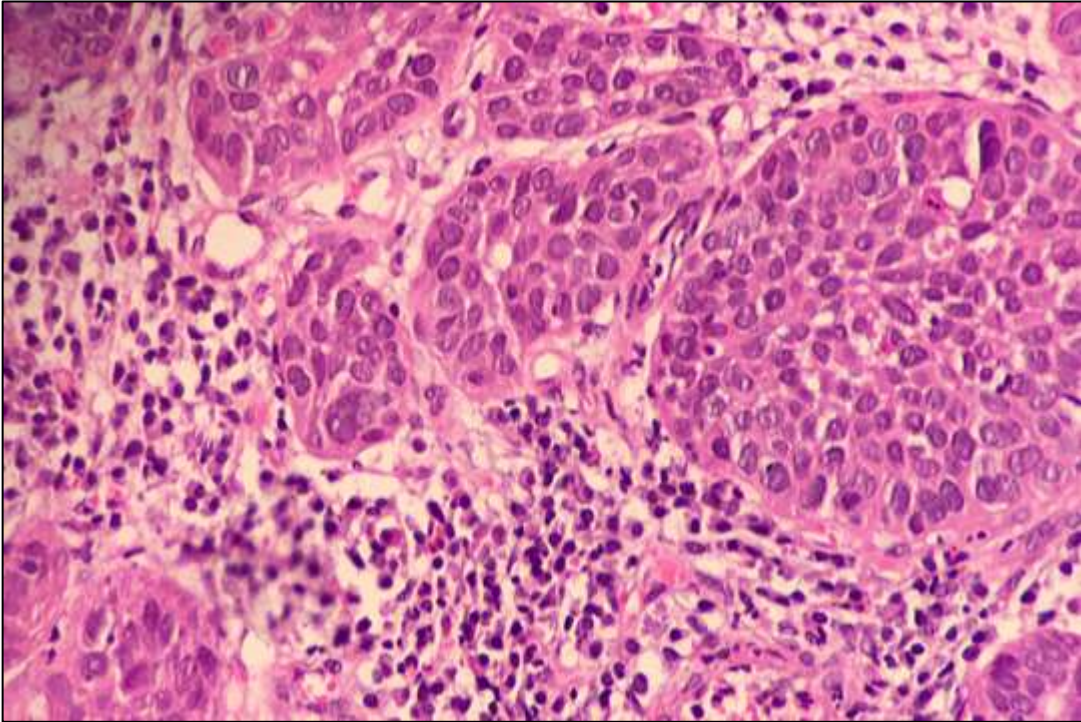
Fonte: Do autor, 2022

Figura 3 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos positivos para fator anti-fibroblastos 3+/3 (anti-FAP, 40x).



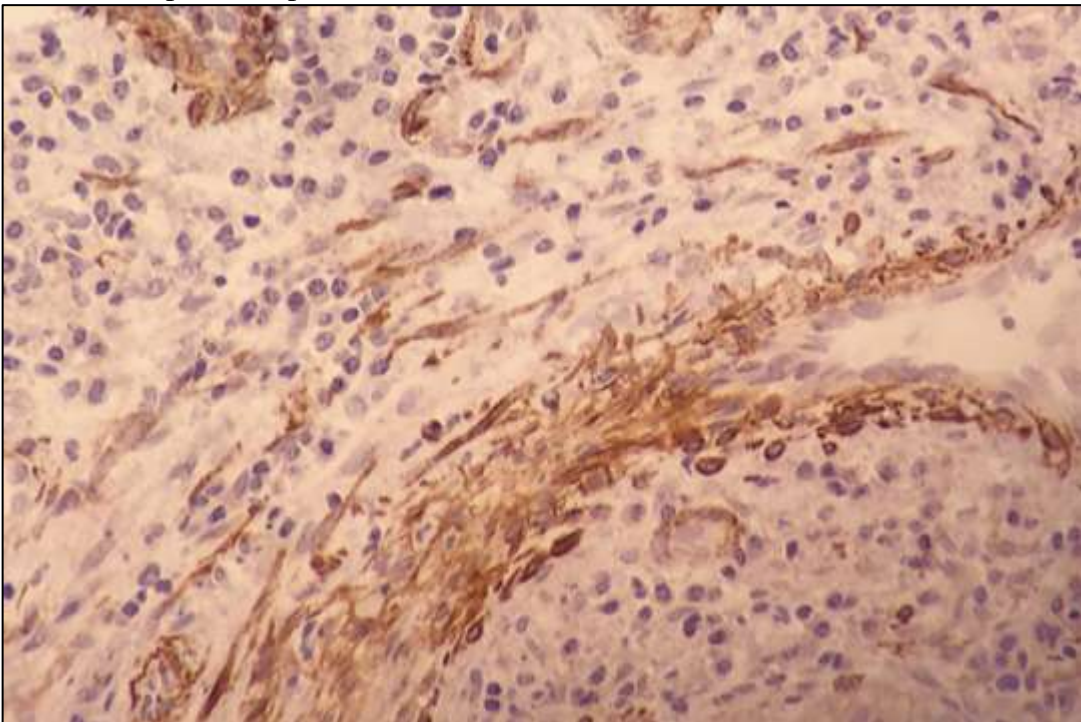
Fonte: Do autor, 2022

Figura 4 – Fotomicrografia de biópsia do colo uterino com carcinoma epidermóide invasor moderadamente diferenciado (HE, 40x).



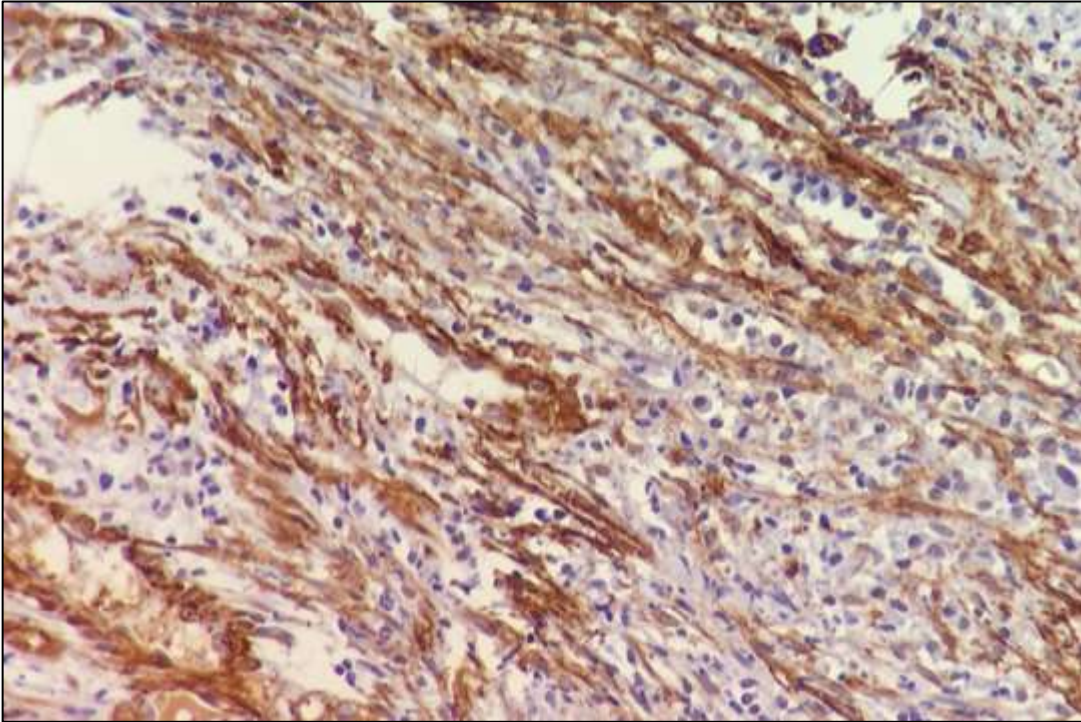
Fonte: Do autor, 2022

Figura 5 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares positivas para actina de músculo liso 2+/3 (SMA, 40x).



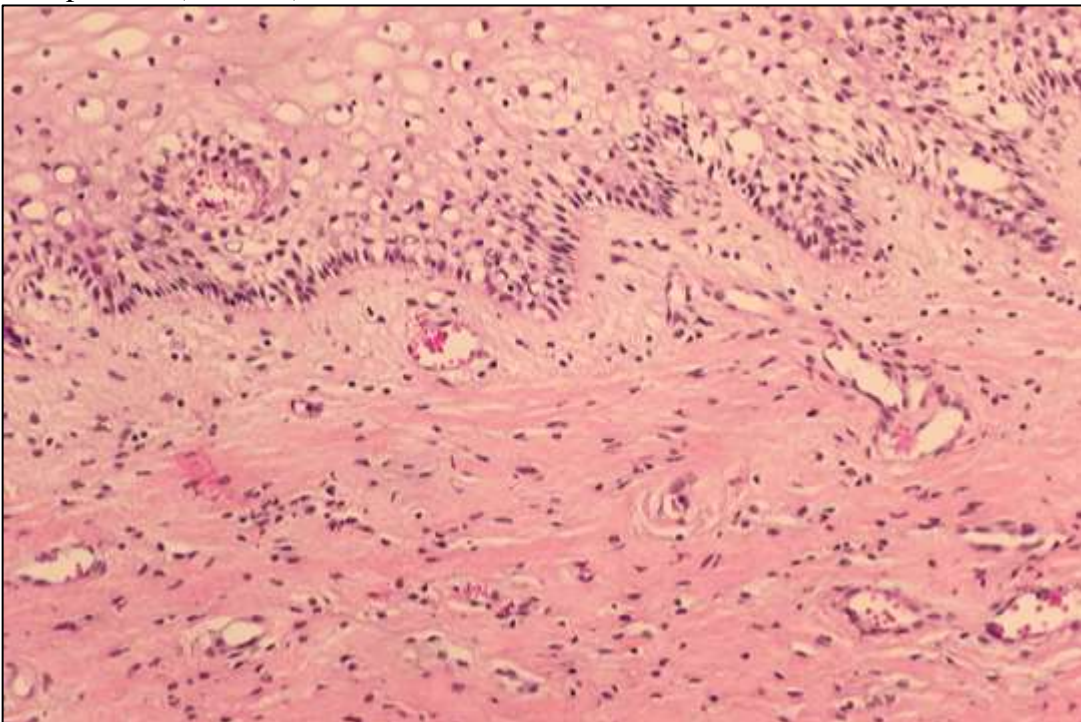
Fonte: Do autor, 2022

Figura 6 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos positivos para fator anti-fibroblastos 3+/3 (anti-FAP, 40x).



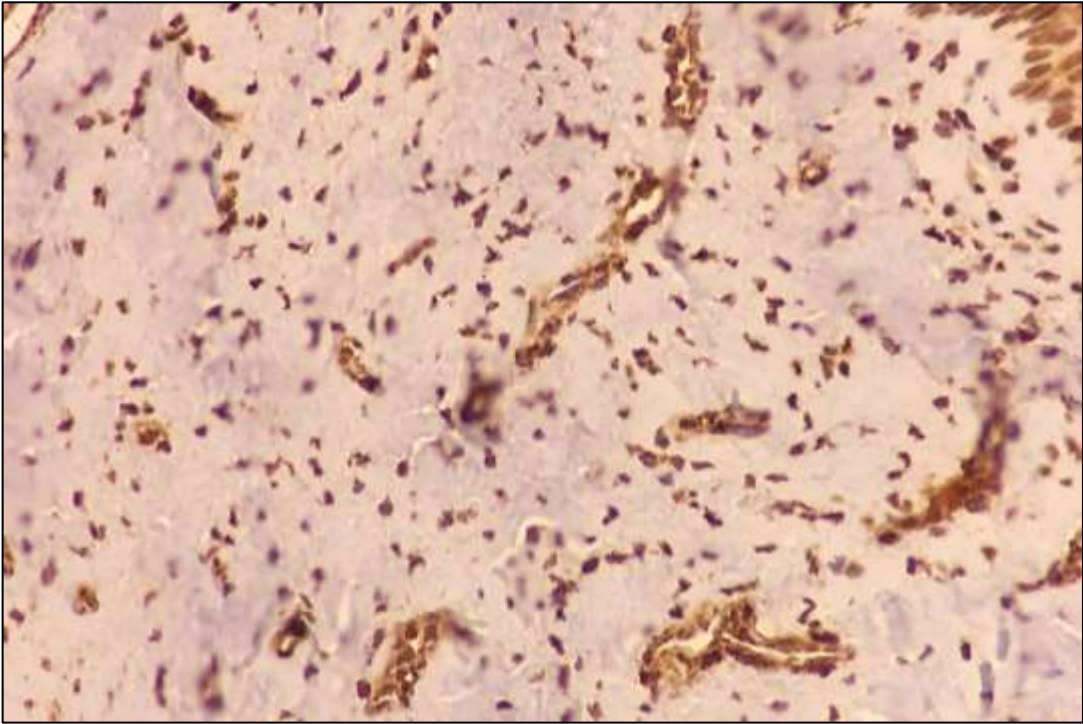
Fonte: Do autor, 2022

Figura 7 – Fotomicrografia de biópsia do colo uterino com leve cervicite inespecífica (HE, 20x).



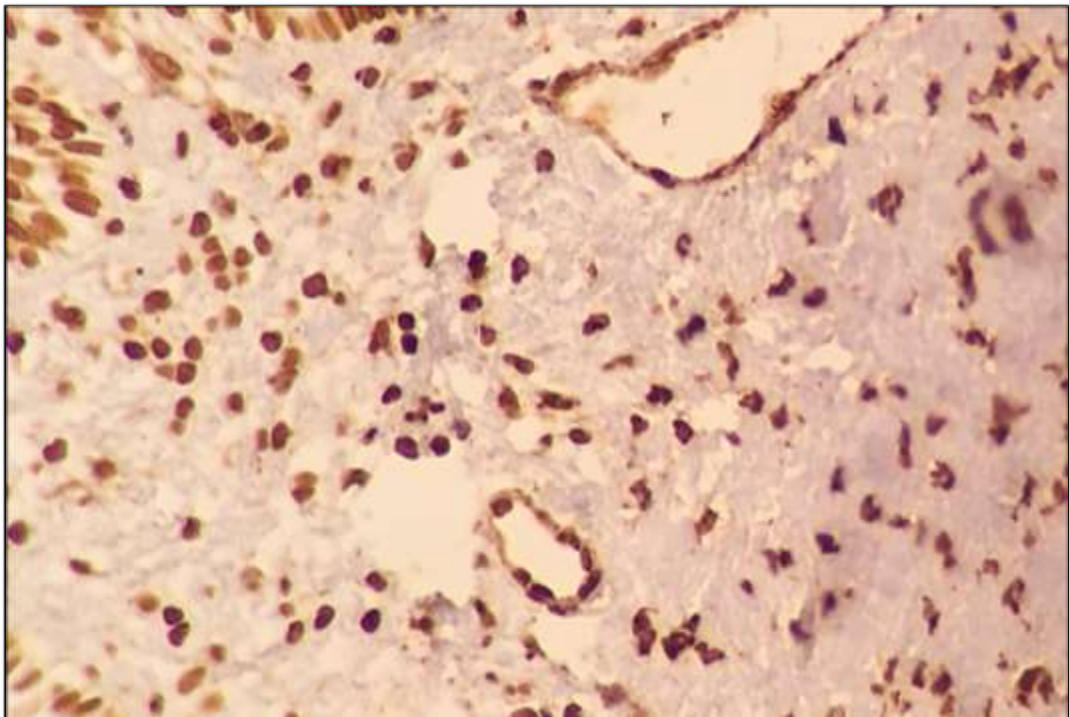
Fonte: Do autor, 2022

Figura 8 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares e pequenos capilares positivos para actina de músculo liso 1+/3 (SMA, 40x).



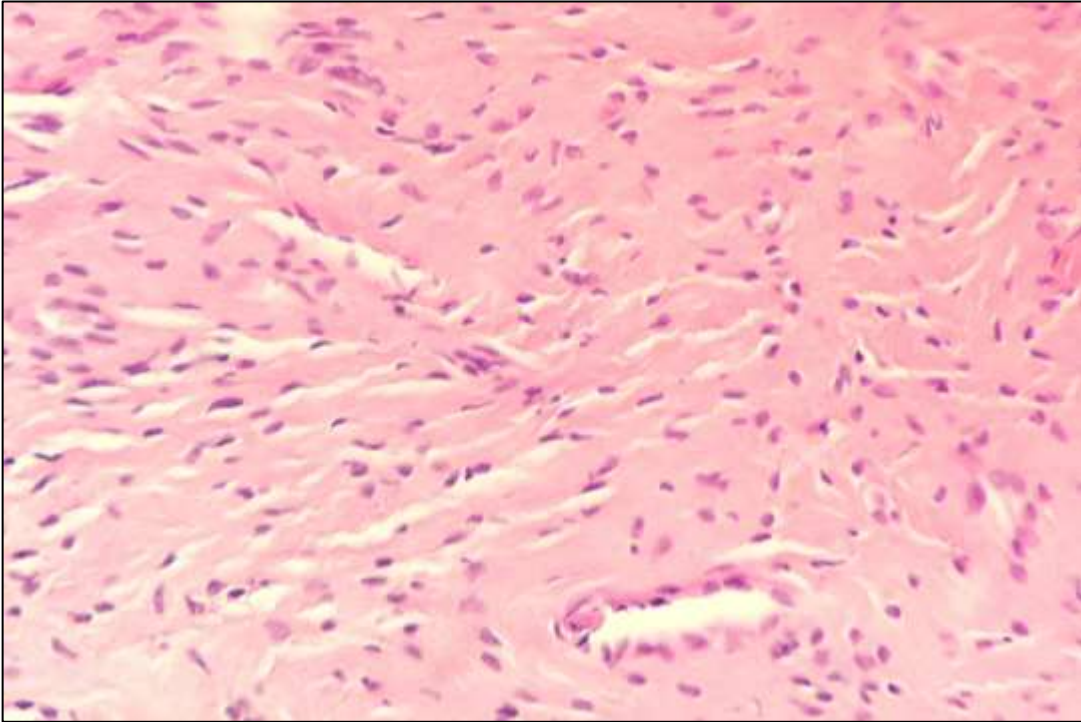
Fonte: Do autor, 2022

Figura 9 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos e pequenos capilares positivos para fator anti-fibroblastos 2+/3 (anti-FAP, 40x).



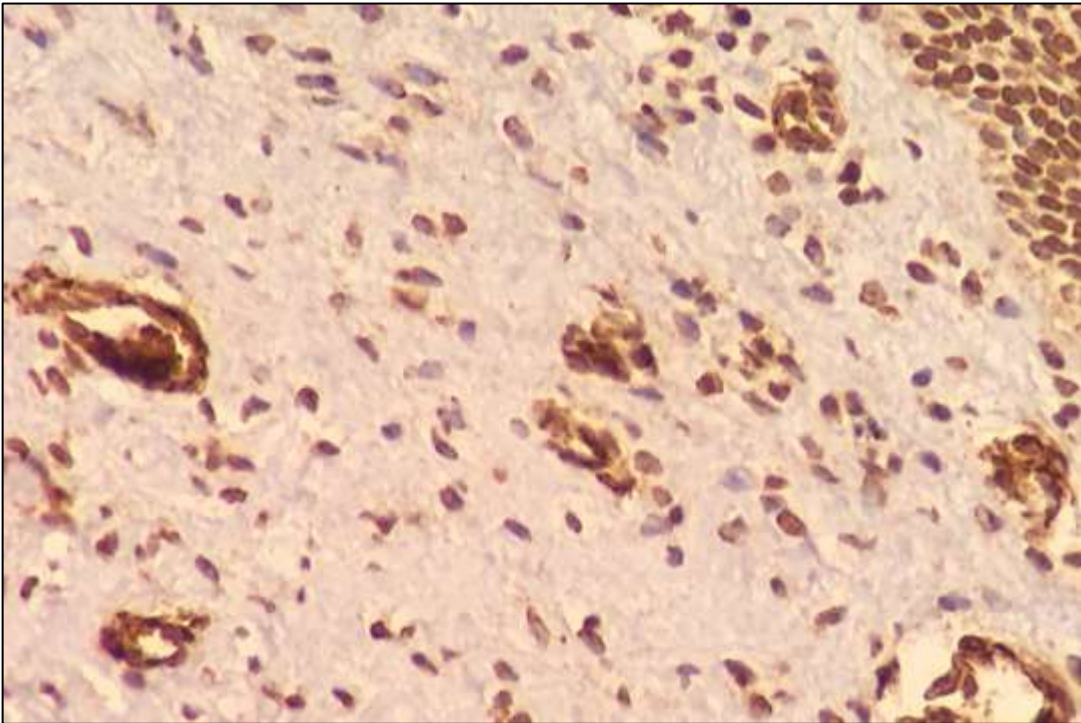
Fonte: Do autor, 2022

Figura 10 – Fotomicrografia de biópsia do colo uterino demonstrando o estroma com pequenos capilares sem alterações (HE, 20x).



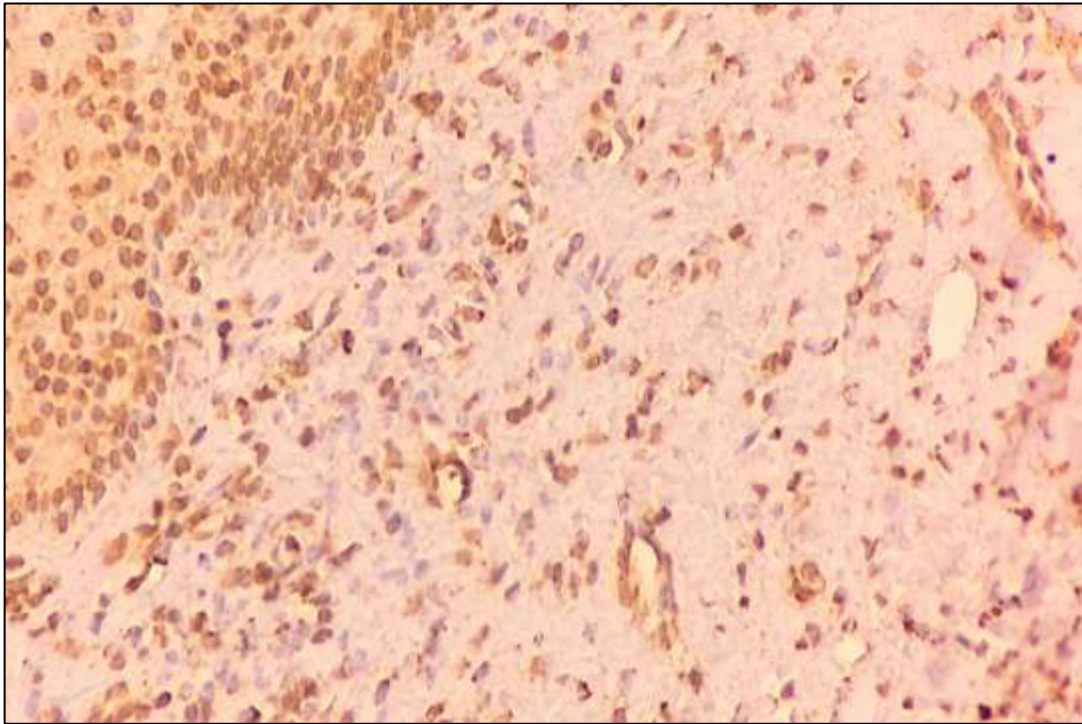
Fonte: Do autor, 2022

Figura 11 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibras musculares e capilares positivos para actina de músculo liso 2+/3 (SMA, 40x).



Fonte: Do autor, 2022

Figura 12 – Fotomicrografia da biópsia anterior demonstrando no estroma fibroblastos e capilares positivos para fator anti-fibroblastos 1+3 (anti-FAP, 40x).



Fonte: Do autor, 2022

3.3 CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Foi obtido consentimento de todas as pacientes incluídas no estudo na data do diagnóstico no ambulatório de Oncologia Ginecológica e verificação de que a paciente se enquadrava nos critérios de inclusão. Para o grupo controle, o termo de consentimento foi obtido no ambulatório de pré-operatório (Apêndice A).

3.4 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFTM sob o CAAE 22725019.2.0000.5154, de número 3.988.424 (Anexo A).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo GraphPad Prism software. Os resultados foram expressos em medianas, valores mínimos e máximos. As imunomarcações dos marcadores de estroma foram comparadas entre os grupos através do teste exato de Fisher. Os resultados dos parâmetros de hemograma foram comparados entre os grupos através de Teste Mann-Whitney. As diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

No estudo imunohistoquímico, a concordância entre dois observadores será 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.

4 RESULTADOS

As características gerais e os parâmetros do hemograma dos grupos de pacientes com câncer do colo uterino e mioma uterino estão representadas na tabela 1. O tipo histológico, grau histológico e estadiamento das pacientes do grupo de câncer do colo uterino estão representadas na tabela 2.

Tabela 1: Características gerais e parâmetros do hemograma dos grupos de pacientes com câncer do colo uterino e mioma uterino atendidas no Hospital de Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, 2020-2022 (Mediana, mínimo e máximo, ou n e percentagem).

| | Câncer do colo | Mioma |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| | n = 16 | n = 22 |
| Idade (anos) | 50 (26-67) | 46 (41-55) |
| Paridade (partos) | 3 (1-6) | 2 (0-5) |
| Status hormonal | | |
| Menacme | 7 (43,75%) | 22 (100%) |
| Menopausa | 9 (56,25%) | 0 (0%) |
| Plaquetas (mil/mm ³) | 281,5 (174-903) | 321(98-497) |
| RNL | 4,4 (2,06-47,48) | 2,32 (0,82-8,29) |
| RPL | 200,7 (123,14-748,13) | 164,6 (78,99-263,33) |
| RDW | 13,85 (13-23,6) | 14 (12,6-23,3) |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

Observação – Valores de referência para mulheres: Plaquetas: 150.000 – 400.000/mm³, RDW: 11,5 – 15,0%.

Tabela 2: Características do grupo de pacientes com câncer do colo uterino atendidas no Hospital de Clínicas da UFTM, Uberaba-MG, 2020-2022, quanto ao tipo histológico, grau histológico e estadiamento (mediana, mínimo e máximo, ou n e percentagem).

| | n | % |
|-------------------------|----|-------|
| Tipo histológico | | |
| Epidermóide | 15 | 93,75 |
| Não epidermóide | 1 | 6,25 |
| Grau histológico | | |
| Grau 1 | 5 | 31,25 |
| Grau 2 | 8 | 50 |
| Grau 3 | 3 | 18,75 |
| Estadiamento | | |
| IIB | 5 | 31,25 |
| IIIA | 1 | 6,25 |
| IIIB | 7 | 43,75 |
| IIIC1 | 1 | 6,25 |
| IIIC2 | 0 | 0 |
| IVA | 2 | 12,5 |
| IVB | 0 | 0 |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

A imunomarcção forte (2/3) por FAP foi mais frequente em pacientes com câncer do colo uterino quando comparado com pacientes com mioma (grupo controle) ($p=0,0005$). Em relação a SMA, a imunomarcção forte (2/3) também foi mais encontrada no grupo de pacientes com câncer comparado ao grupo de pacientes com mioma ($p < 0.00001$) (tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Imunomarcção da Proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP) em câncer de colo uterino e mioma uterino, Uberaba-MG, 2020-2022.

| | FAP (0 / 1) | FAP (2 / 3) | p |
|------------------------|-------------|-------------|--------|
| Câncer cervical (n=16) | 1 (6,25%) | 15 (93,75%) | 0,0005 |
| Mioma (n=22) | 14 (63,64%) | 8 (36,36%) | |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

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

Tabela 4: Imunomarcção da alfa-actina de músculo liso (SMA) em câncer do colo uterino e mioma uterino, Uberaba-MG, 2020-2022.

| | SMA (0 / 1) | SMA (2 / 3) | p |
|-----------------------|-------------|-------------|-----------|
| Câncer de colo (n=16) | 0 (0%) | 16 (100%) | < 0.00001 |
| Mioma (n=22) | 19 (86,36%) | 3 (13,64%) | |

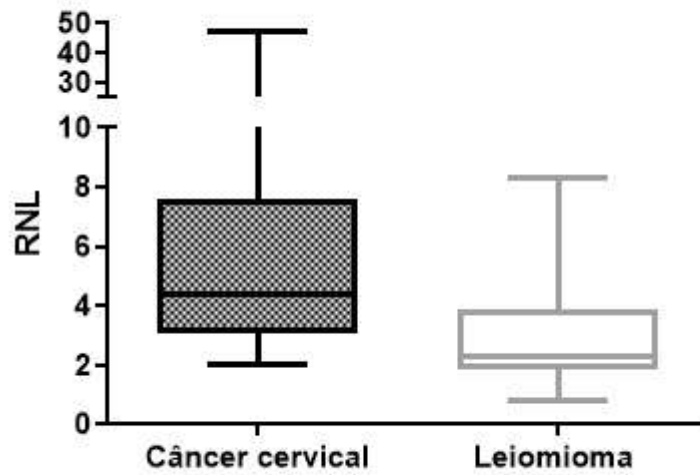
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

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

Os valores de RNL foram mais elevados no grupo de pacientes com câncer (mediana=4,4; mínimo=2,06; máximo=47,48) comparado com o grupo controle (mediana=2,32; mínimo=0,82; máximo=8,29) ($p=0,0019$). Em relação aos valores de RPL, esses foram também mais altos no grupo câncer (mediana=200,7; mínimo=123,14; máximo=748,13) que no grupo de leiomioma (mediana=164,6; mínimo=78,99; máximo=263,33), mas no limiar de significância ($p=0,0675$). Não houve diferença significativa nos valores de plaquetas e RDW na comparação entre esses grupos ($p=0,3986$ e $p=0,9095$, respectivamente) (figuras 13 a 16).

Figura 13: Relação neutrófilo-linfócito em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas ($p=0,0019$).

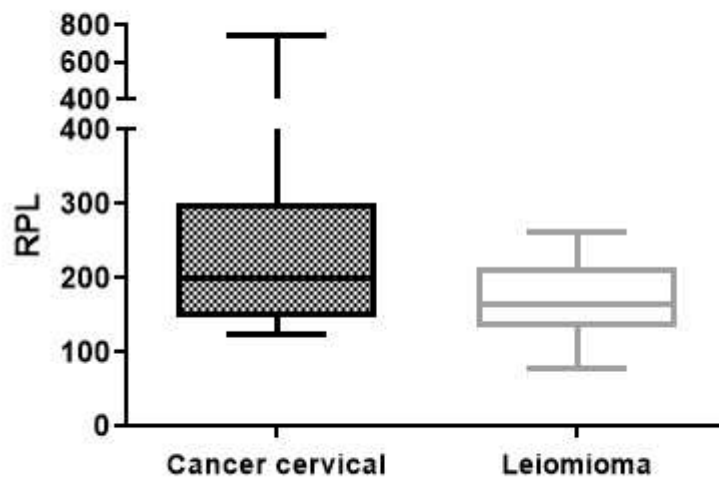
RNL em câncer cervical uterino e leiomioma



Fonte: Do autor, 2022

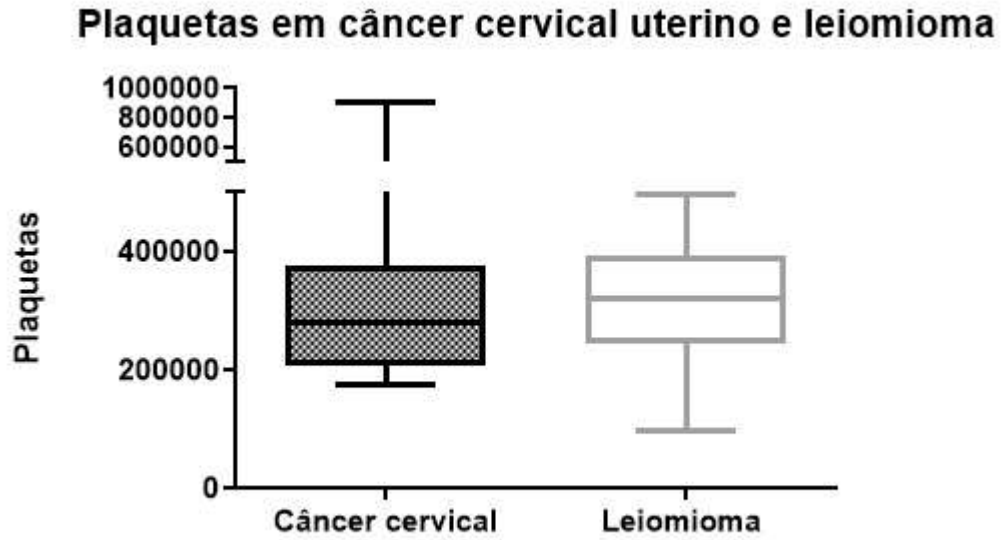
Figura 14: Relação plaqueta-linfócito em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas ($p=0,0675$).

RPL em câncer cervical uterino e leiomioma



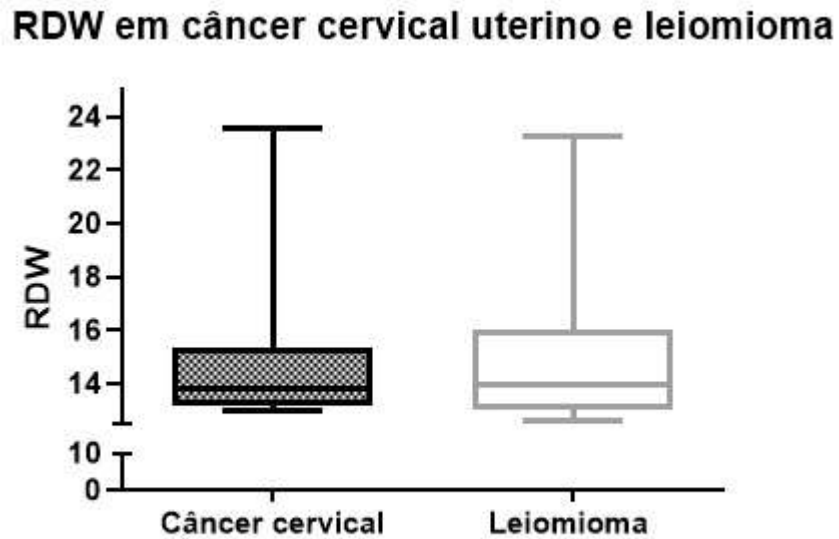
Fonte: Do autor, 2022

Figura 15: Valor absoluto de plaquetas ($/\text{mm}^3$) em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas ($p=0.3986$).



Fonte: Do autor, 2022

Figura 16: RDW em pacientes com câncer do colo uterino e leiomiomas ($p=0,9095$).



Fonte: Do autor, 2022

Não houve diferença significativa na avaliação dos 2 marcadores de estroma em câncer do colo uterino no estudo de fatores prognósticos patológicos (estadiamento e grau histológico) e nem no estudo de fatores sistêmicos (plaquetas, RNL, RPL e RDW).

5 DISCUSSÃO

Os componentes estromais são constituintes comuns da maior porcentagem do volume tumoral, e o microambiente tumoral é essencial para sua sobrevivência. O estroma tumoral consiste em células tumorais não-malignas, como fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células mesenquimais, células imunes, células endoteliais e pericitos, e também a matriz extracelular (YANG et al., 2013). A partir daí, o crescimento contínuo das células tumorais está ligado ao fornecimento de nutrientes, formação de vasos sanguíneos tumorais, linfócitos e fatores de crescimento; associados às alterações caracterizadas no estroma de apoio (LEBEAU et al., 2009).

Segundo Huang et al. (2019), o microambiente tumoral vem recebendo mais atenção nos últimos anos; várias células inflamatórias são componentes importantes do microambiente tumoral. Neutrófilos, linfócitos, plaquetas e proteínas de fase aguda contribuem para a resposta inflamatória, podendo ser detectadas através de exame de hemograma (HUANG et al., 2019). A primeira vez que foi percebida a associação entre inflamação e câncer, ocorreu em 1863 por Virchow (BALKWILL et al., 2001). A resposta inflamatória tumoral tem o potencial de promover a mutagênese celular e um microambiente de inflamação crônica, com muitas células inflamatórias que geram altos níveis de oxigênio reativo (HUANG et al., 2019).

O acúmulo de células semelhantes a fibroblastos, os miofibroblastos, constantemente mostra associação à borda da região peritumoral. A SMA revelou forte positividade estromal, indicando a presença de ativado de miofibroblastos que são os principais produtores da matriz extracelular no estroma (LI et al., 2009). No presente estudo, em relação à SMA, a imunomarcacão forte também foi mais encontrada no grupo de pacientes com câncer do colo, demonstrando os miofibroblastos estromais SMA positivos associados.

A proteína de ativação do fibroblasto (FAP) surgiu como um marcador específico de fibroblastos reativos em tumores. É altamente expresso em fibroblastos estromais reativos em carcinomas epiteliais. As células de carcinoma epitelial também são FAP-negativas. A FAP contribui para a neovascularização dentro dos tumores, além de aumentar a tumorigenicidade

(LAI et al., 2012). Neste estudo, a imunomarcção forte por FAP ocorreu com maior frequência no grupo de pacientes com cncer do colo do útero.

O mecanismo subjacente aos nossos estudos não foi elucidado. No entanto, existem algumas explicações possíveis para nossa observação. As doenças inflamatórias podem aumentar o risco de desenvolver muitos tipos de cncer, incluindo o do colo do útero. Mudanças oncogênicas induzem o microambiente inflamatório, o que promove o surgimento de tumores. A variação da resposta imune tem sido observada em diferentes tipos de cncer (LEE et al., 2012).

A RNL pré-tratamento pode ser um biomarcador potencial de baixo custo, especialmente importante em países em desenvolvimento, onde o cncer do colo do útero; no caso o Brasil, ocupa o terceiro lugar em taxa de mortalidade proporcional por cncer em mulheres, 2020 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2022).

Nomelini et al. (2022) demonstraram que a contagem absoluta de bastonetes maior que $273/\text{mm}^3$ foi um potencial preditor de menor sobrevida global em mulheres com cncer cervical invasivo. Essa contagem pode ser de grande utilidade clínica, além de ser de baixo custo, menos invasiva e de fácil execução. Segundo De Lima et al. (2021), no cncer de colo uterino, maiores valores de NLR e PLR foram encontrados nos estádios II a IV quando comparados ao estágio I ($p = 0,0066$ e $p = 0,005$, respectivamente). Curvas ROC foram realizadas. Nas neoplasias invasivas, os valores de corte para NLR e PLR na comparação entre estágio I e maior que I foram 4 e 165,45, respectivamente. Para curvas de sobrevida, houve menor sobrevida global e sobrevida livre de doença nas pacientes com relação neutrófilo-linfócito maior que 4 ($p=0,0004$ e $p=0,0153$, respectivamente) e relação plaqueta-linfócito maior que 165,45 ($p = 0,0319$ e $p = 0,0362$, respectivamente). Após análise multivariada, apenas NLR permaneceu como fator independente em sobrevida livre de progressão (HR = 6,095, IC 95% = 1,120-33,177, $p = 0,037$) e sobrevida global (HR = 4).

Os indicadores RNL e RPL são baseados em inflamação, todos com valor preditivo significativo para vários tipos de cncer. Neste estudo relacionamos o biomarcador RPL para o cncer do colo. As células inflamatórias periféricas pré-tratamento se mostram disponíveis, biomarcadores expressam a resposta inflamatória sistêmica às manifestações do cncer. Constatamos que a RPL foi mais alta no grupo com cncer. Estudos apontam a RPL como um bom biomarcador na previsão de metástase de linfonodo. Grupo com cncer e RPL elevado que passaram por cirurgia; um alto grau de RPL é indicativo de maior risco de metástase linfonodal, sugerindo a necessidade de biópsia do linfonodo para-aórtico. O estudo de Zhang

et al. 2014, revelou uma vantagem da RPL sobre a RNL apontando no resultado clínico para o câncer do colo do útero. Diferentemente de outros fatores de risco pós-operatórios, a RPL atua como índice pré-operatório na previsão de metástases linfonodais, podendo contribuir com informações importantes para determinar a linha de tratamento cirúrgico e pós-operatório a seguir.

A inflamação desempenha fundamental processo na tumorigênese e no avanço do câncer do colo. No presente estudo focamos na determinação da significância preditiva do marcador de inflamação RDW, mas não houve diferença significativa nos valores na comparação entre os grupos do estudo. O RDW tradicionalmente é utilizado para o diagnóstico diferencial de anemia microcítica, sendo proposto como marcador de inflamação sistêmica para doenças inflamatórias crônicas (WANG et al., 2017). Além disso, pacientes com câncer têm valores mais elevados de RDW em comparação com pacientes saudáveis. Outra característica é que a RDW elevada está associada ao estágio do câncer e às características histopatológicas. No presente estudo não detectamos diferença significativa nos valores de plaquetas e RDW, podendo sugerir que o papel biológico do RDW no câncer do colo do útero pode diferir para outros cânceres. Esse estudo sugeriu que os valores pré-tratamento de NLR e PLR podem ser úteis para prever a presença de metástases à distância e linfonodos em pacientes com carcinoma cervical, mas não fatores prognósticos adequados para pacientes em estágio inicial.

Para decidir a linha de tratamento a seguir para o câncer, os fatores prognósticos são de extrema importância. O estroma tumoral contém dados prognósticos distintos evidenciados por células vasculares e células imune no movimento da progressão neoplásica. Os marcadores FAP e SMA foram avaliados em câncer do colo (no microambiente estromal), sendo vários estudos realizados mostrando que o comportamento dos fibroblastos e as características influenciam as respostas terapêuticas. Numerosas estratégias foram desenvolvidas usando fibroblastos associados ao câncer (CAFs) para lidar com fatores prognósticos. O aumento da expressão de FAP em neoplasias malignas, correlacionam-se com estudos de ERRARTE et al. 2016, que observou maior expressão de FAP em tumores primários e ainda estatisticamente relação entre a agressividade tumoral e a expressão FAP. Alguns CAFs são identificados pela ampla expressão de SMA, mas sua ação isolada não expressa explosões de fibroblastos associados ao câncer. SMA são capazes de acelerar a cicatrização de feridas, processo que ocorre através da contração de extremidades; após esse processo as células sofrem apoptose. SMA corresponde a uma valiosa proteína expressa pela

célula que contribui para a deposição da matriz extracelular, indicando a presença de ativado de miofibroblastos (YANG et al., 2013).

A presença da imunomarcção para SMA na célula cancerígena é responsável por criar um ambiente permissivo para a progressão do tumor (WU et al., 2008). Tal relação fica evidente quando é possível observar que quase a totalidade de pacientes com carcinoma cervical invasivo apresentam a imunomarcção para SMA, enquanto nenhuma das pacientes com carcinomas intraepiteliais ou células normais possuem tal marcação. Existe assim, uma forte relação entre associação da transformação de neoplasia intraepitelial cervical em carcinoma invasivo (LI et al., 2009; XIAO et al., 2022). Isso reforça nosso resultado, visto que no presente estudo, a imunomarcção forte (2/3) para SMA foi mais encontrada no grupo de pacientes com câncer quando comparado ao grupo de pacientes com mioma.

A imunomarcção forte por FAP (2/3) do presente estudo foi elevada nas células cancerígenas quando comparado com as células normais. Sabe-se que esse biomarcador tem potencial alvo terapêutico, mas a sua expressão não se correlaciona com os resultados clínicos, não tendo assim relação com o prognóstico do câncer de colo em pacientes virgens de tratamento. Contudo, sua marcação presente pode ser utilizada para terapia direcionada ou imagem (SUN et al., 2022).

Além da degradação da membrana basal, a invasão do câncer de colo de útero é realizada pela remodelação do estroma intersticial. Assim, algumas proteínas e fibroblastos desempenham um papel importante na patogênese do câncer cervical (FULLÁR et al., 2015). A FAP é um marcador imuno-histoquímicos com potencial alvo terapêutico em vários tipos de carcinoma ginecológico e geniturinário, mas que não demonstrou tanta significância prognóstica no câncer do colo do útero sem tratamento prévio, já que sua expressão não se correlacionou com os resultados clínicos. Entretanto, foi evidenciado que a FAP pode ter utilidade na neoplasia cervical em terapia direcionada (SUN et al., 2022). Em nosso estudo, não houve diferença significativa na avaliação dos dois marcadores de estroma em câncer de colo uterino no estudo de fatores prognósticos patológicos (estadiamento e grau histológico) e nem no estudo de fatores sistêmicos (plaquetas, RNL, RPL e RDW).

Algumas limitações também existem em nosso estudo. A principal limitação é o pequeno tamanho amostral das pacientes. Contudo, apesar da limitação, nosso estudo foi o primeiro na literatura a comparar marcadores de estroma e parâmetros de hemograma com um grupo controle de pacientes com leiomioma uterino, podendo ser alvo para novos estudos relacionados à carcinogênese e a novos tratamentos nessa doença, que cuja morbimortalidade ainda tem tanto impacto principalmente nos países em desenvolvimento. Além disso, nossos

resultados podem ter potencial em estudos futuros sobre as relações do estroma com a resposta inflamatória sistêmica, lembrando que o hemograma é um exame simples, barato, de fácil coleta.

6 CONCLUSÃO

A imunomarcção forte (2/3) por FAP e SMA foi mais encontrada no grupo de pacientes com cncer de colo uterino quando comparado com o grupo de pacientes com mioma. Os valores de RNL foram mais elevados no grupo de pacientes com cncer quando comparado com o grupo controle. Em relao aos valores de RPL, esses foram tambm mais altos no grupo cncer que no grupo de leiomioma, mas no limiar de significncia. No houve diferena significativa nos valores de plaquetas e RDW na comparao entre esses grupos. Tambm no houve diferena na avaliao dos 2 marcadores de estroma em cncer de colo uterino no estudo de fatores prognsticos patolgicos (estadiamento e grau histolgico) e nem no estudo de fatores sistmicos (plaquetas, RNL, RPL e RDW).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIA, Scott J. et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 24, p. 2342-2350, 2018.
- BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.
- BARKER, Holly E. et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 7, p. 409-425, 2015.
- BHATLA, Neerja et al. Cancer of the cervix uteri. **International journal of gynecology & obstetrics**, v. 143, p. 22-36, 2018.
- BOUGHERARA, Houcine et al. Real-time imaging of resident T cells in human lung and ovarian carcinomas reveals how different tumor microenvironments control T lymphocyte migration. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 500, 2015.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BUTCHER, Eugene C.; PICKER, Louis J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 60-67, 1996.
- DA SILVA, Rafael de Carvalho et al. Association of anemia and neutrophil-lymphocyte ratio with overall survival in breast cancer patients. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 43, n. 3, p. 97-102, 2022.
- DELANEY, Geoff et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 104, n. 6, p. 1129-1137, 2005.
- DE LIMA, Patrícia Santos Vaz et al. Laboratory parameters as predictors of prognosis in uterine cervical neoplasia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 256, p. 391-396, 2021.
- ERRARTE, Peio et al. The expression of fibroblast activation protein in clear cell renal cell carcinomas is associated with synchronous lymph node metastases. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0169105, 2016.
- FAILACE, R; FERNANDES F. **Hemograma: manual de interpretação**. 5ª Ed. Porto Alegre, Artmed Editora, 2009.
- FIGUEIREDO, Cláudia Roberta LV. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 55, p. 321-332, 2019.

FULLÁR, Alexandra et al. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2015.

GHILARDI, Carmen et al. Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2008.

GOEPPERT, Benjamin et al. Major histocompatibility complex class I expression impacts on patient survival and type and density of immune cells in biliary tract cancer. **British journal of cancer**, v. 113, n. 9, p. 1343-1349, 2015.

GRIFFIOEN, Arjan W. et al. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. **Cancer research**, v. 56, n. 5, p. 1111-1117, 1996.

GUIMARÃES, Alexandre Costa et al. O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. **Revista HCPA**. Vol. 31, n. 1 (2011), p. 66-72, 2011.

HAMZAH, Juliana et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 410-414, 2008.

HERNANDEZ, Celine; HUEBENER, Peter; SCHWABE, Robert F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. **Oncogene**, v. 35, n. 46, p. 5931-5941, 2016.

HINIKER, Susan M.; CHEN, Daniel S.; KNOX, Susan J. Abscopal effect in a patient with melanoma. **N Engl J Med**, v. 366, n. 21, p. 2035, 2012.

HUANG, Huaping et al. Prognostic value of preoperative systemic immune-inflammation index in patients with cervical cancer. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019.122p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Dados e números sobre câncer do colo do útero**. Relatório anual. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-do-colo-do-uterio-relatorio-anual-2022>. Acesso em: 10 out. 2022.

JOHANSSON, Anna; HAMZAH, Juliana; GANSS, Ruth. More than a scaffold: stromal modulation of tumor immunity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1865, n. 1, p. 3-13, 2016.

KALINSKI, Pawel. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.

KEPP, Oliver; SENOVILLA, Laura; KROEMER, Guido. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5190, 2014.

KOBAYASHI, Hiroaki et al. Expression of α -smooth muscle actin in benign or malignant ovarian tumors. **Gynecologic oncology**, v. 48, n. 3, p. 308-313, 1993.

LAI, Dongmei; MA, Li; WANG, Fangyuan. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. **International journal of oncology**, v. 41, n. 2, p. 541-550, 2012.

LANITIS, E. et al. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors. **Annals of Oncology**, v. 28, p. xii18-xii32, 2017.

LEE, Yoo-Young et al. Pretreatment neutrophil: lymphocyte ratio as a prognostic factor in cervical carcinoma. **Anticancer research**, v. 32, n. 4, p. 1555-1561, 2012.

LEBEAU, Aaron M. et al. Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promelittin protoxin. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 1378-1386, 2009.

LI, Q.; HUANG, W.; ZHOU, X. Expression of CD34, α -Smooth Muscle Actin and Transforming Growth Factor- β 1 in Squamous Intraepithelial Lesions and Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 2, p. 446-454, 2009.

MANTOANI, Priscila Thais Silva; NOMEINI, Rosekeila Simões; MURTA, Eddie Fernando Candido. Manejo conservador em neoplasia intraepithelial cervical de alto grau. Ed. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2021.

MENON, Hari et al. Role of radiation therapy in modulation of the tumor stroma and microenvironment. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 193, 2019.

MOTZ, Gregory T. et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. **Nature medicine**, v. 20, n. 6, p. 607-615, 2014.

NOMEINI, Rosekeila Simões et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet count as prognostic factors in ovarian malignancies. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.15, n. 6, p. 1226-1230, 2019.

NOMEINI, Rosekeila Simões; MOTA, Sâmela Daiere Soares; MURTA, Eddie Fernando Candido. Absolute band neutrophils count is a predictor of overall survival in advanced uterine cervical cancer. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, p. 1-5, 2022.

PERANZONI, Elisa et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 17, p. E4041-E4050, 2018.

ROBBINS, Stanley; COTRAN, Ramzi S. **Patologia Bases patológicas das Doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro, 2004. p. 1124-1125.

SALMON, Hélène et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 899-910, 2012.

STEEL, G. G.; COURTENAY, V. D.; PECKHAM, M. J. The response to chemotherapy of a variety of human tumour xenografts. **British journal of cancer**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 1983.

SUN, Lulu et al. Expression of Potential Biomarker Targets by Immunohistochemistry in Cervical Carcinomas. **International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, 2022.

THAMES JR, H. D.; WITHERS, H. R. Test of equal effect per fraction and estimation of initial clonogen number in microcolony assays of survival after fractionated irradiation. **The British Journal of Radiology**, v. 53, n. 635, p. 1071-1077, 1980.

TROWELL, O. A. et al. The sensitivity of lymphocytes to ionising radiation. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 64, n. 4, p. 687-704, 1952.

TURCOTTE, Simon et al. Tumor MHC Class I Expression Improves the Prognostic Value of T-cell Density in Resected Colorectal Liver Metastases MHC Class I and T Cells in Colorectal Liver Metastases. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 6, p. 530-537, 2014.

VALKENBURG, Kenneth C.; DE GROOT, Amber E.; PIENTA, Kenneth J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 15, n. 6, p. 366-381, 2018.

WANG, Lin et al. Predictive value of hematological markers of systemic inflammation for managing cervical cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 44824, 2017.

WU, Ming-Ping et al. A novel role of thrombospondin-1 in cervical carcinogenesis: inhibit stroma reaction by inhibiting activated fibroblasts from invading cancer. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1115-1123, 2008.

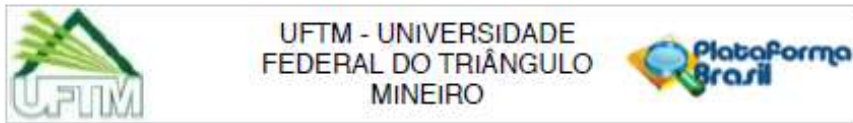
WU, Qiuji et al. Modulating both tumor cell death and innate immunity is essential for improving radiation therapy effectiveness. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 613, 2017.

XIAO, Ling et al. Overexpression of TGF- β 1 and SDF-1 in cervical cancer-associated fibroblasts promotes cell growth, invasion and migration. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 305, n. 1, p. 179-192, 2022.

YANG, WeiWei et al. Fibroblast activation protein- α promotes ovarian cancer cell proliferation and invasion via extracellular and intracellular signaling mechanisms. **Experimental and molecular pathology**, v. 95, n. 1, p. 105-110, 2013.

ZHANG, Yu et al. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio before platelet-lymphocyte ratio predicts clinical outcome in patients with cervical cancer treated with initial radical surgery. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 24, n. 7, 2014.

ZIANI, Linda; CHOUAIB, Salem; THIERY, Jerome. Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts. **Frontiers in immunology**, p. 414, 2018.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia

Pesquisador: Rosekeila Simões Nomelini

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 22725019.2.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.988.424

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

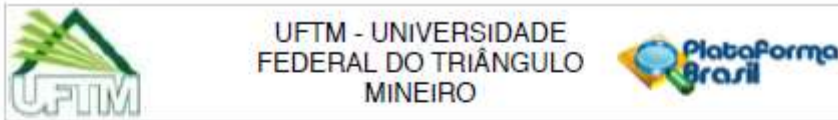
Nas últimas décadas, houve um investimento significativo na compreensão do sistema imunológico e seu papel no crescimento do tumor e na sobrevida global do paciente oncológico. Uma descoberta central tem sido o aprofundamento na comunicação entre células tumorais e o ambiente que circunda esse tumor, também conhecido como estroma.

Novos estudos são necessários para elucidar o tema acerca do tratamento radioterápico e a imunidade antitumoral. Para tanto, se faz necessário o aprofundamento sobre a dinâmica envolvida no estroma, papel evolutivo da radioterapia na imunidade antitumoral, mecanismos imunogênicos de radioterapia e parâmetros do hemograma durante a radioterapia.

O estroma tumoral é constituído por várias células, e a matriz extracelular (MEC) que demonstraram ajudar a suprimir as respostas imunitárias do hospedeiro contra as células tumorais. Através da secreção de citocinas imunossupressoras, alterações metabólicas e outros mecanismos, o estroma tumoral fornece uma rede complexa de salvaguardas para a proliferação tumoral (Menon et al., 2019).

Com os recentes avanços no tratamento localizado mais eficaz, a Radioterapia (RXT) permitiu estratégias que podem efetivamente alterar e remover o tecido estromal do tumor. Isto inclui a promoção de morte celular imunogênica através da liberação de antígeno tumoral para aumentar o tráfego de células imunológicas, a RXT tem uma vantagem única contra os mecanismos de evasão

Endereço: Rua Conde Prados, 191
Bairro: Nossa Sra. Abadía **CEP:** 38.025-290
UF: MG **Município:** LIBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988.424

imunológica tumoral que são orquestrados pelas células estromais (Menon et al., 2019).

Estudos atuais estão em andamento para elucidar vias dentro do estroma tumoral como potenciais alvos para imunoterapia e quimiorradiação. Os efeitos do estroma tumoral na evasão imune do tumor, como a RXT pode ajudar a superar esses efeitos, com possíveis abordagens combinatórias para futuras modalidades de tratamento serão explicados abaixo (Menon et al., 2019).

A radioterapia é um padrão ouro no tratamento do câncer, com mais de 50% dos pacientes com câncer precisando de terapia local com esse tratamento. Com o crescente conhecimento do papel do microambiente do tumor na evasão imune, o interesse no efeito da RXT no microambiente do tumor está crescendo. Desde o aumento da apresentação do antígeno do tumor até a facilitação do tráfego de células T, a RXT desempenha um importante papel imunogênico no tratamento do câncer e do seu microambiente (Delaney et al., 2005).

No estroma, tanto as células tumorais quanto os abundantes M2 secretam várias moléculas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a interleucina (IL) -10, o fator transformador de crescimento (TGF)- β , a adenosina e a prostaglandina E2, que inibem ativação DC e maturação e suprimir a atividade de CTLs e imunidade mediada por assassinos naturais (Lanitis et al., 2017).

Da mesma forma, a secreção de prostaglandina E2 modula a produção de quimiocinas em favor da diferenciação de células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de células mielóides (MDSCs), inibindo linfócitos T citotóxicos (CTLs) e populações de células natural killer e diminui a produção de IL-2 e IL-12 (Kalinski, 2019) macrófagos associados a tumores (TAMs) têm papéis imunossupressores que se estendem além da produção de fatores solúveis. O fenotipo "imunoecluído" pode ocorrer fisicamente por meio de interações duradouras entre CTLs e TAMs. Os macrófagos estromais impedem que as células T CD8+ atinjam as ilhotas tumorais, estabelecendo contatos duradouros que reduzem a motilidade das células T (Peranzoni et al., 2018).

A vascularização tumoral pode desempenhar um papel importante nos mecanismos estromais da exclusão imune. A migração de células T através do endotélio, que muitas vezes é desregulada como resultado do remodelamento da vasculatura, é outro desafio para a imunidade antitumoral. Para as células T migrarem para o leito tumoral, elas devem aderir ao endotélio (Butcher et al., 1996). Entretanto, a expressão de várias moléculas de adesão endotelial, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e a proteína de adesão vascular (VCAM) -1, é regulada negativamente em células endoteliais circundando tumores sólidos (Griffioen et al., 1996).

Endereço: Rua Conde Prados, 191

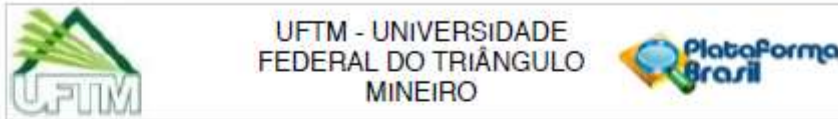
Bairro: Nossa Sra. Abadia

UF: MG Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6803

CEP: 38.025-260

E-mail: cep@uftm.edu.br



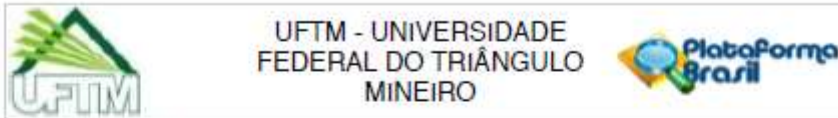
Continuação do Parecer: 3.988.424

Recentemente, Motz e colegas descreveram um mecanismo pelo qual a barreira endotelial do tumor regula a migração de células T para tumores. Na vasculatura de tumores humanos e de camundongos, a expressão do ligante Fas (FasL), que induz a apoptose, foi detectada, mas não foi detectada na vasculatura normal. Além disso, a expressão de FasL no endotélio foi associada à menor infiltração de CD8⁺ e acúmulo de Tregs, que foram resistentes ao FasL devido à maior expressão de c-FLIP. No entanto, este enfraquecimento da infiltração de células T CD8⁺ foi revertido por inibição farmacológica de prostaglandina E2 e VEGF, que demonstraram cooperativamente induzir a expressão de FasL nesta barreira de morte endotelial do tumor (Motz et al., 2014).

A arquitetura densa da matriz do estroma também apresenta um desafio único à infiltração de células T, e a redução da matriz com colagenase mostrou melhorar a infiltração de células T (Salmon et al., 2012; Bougherara et al., 2015). Finalmente, os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no estroma têm papéis pleiotrópicos na secreção de quimiocinas, citocinas e metabólitos que alteram a imunidade antitumoral (Ziani, Chouaib e Thiery, 2018). Estratégias moleculares para normalizar a vasculatura tumoral e induzir estruturas linfoides terciárias têm se mostrado muito promissoras na orquestração da imunoterapia de células T eficaz de forma pré-clínica (Ziani, Chouaib e Thiery, 2018; Hamzah et al., 2008; Johansson, Hamzah e Gansse, 2015). Em geral, as células tumorais empregam uma combinação desses mecanismos acima, excluindo as células T citotóxicas do microambiente tumoral, diminuindo a imunidade antitumoral. O campo da biologia da radiação enfocou historicamente os efeitos da radiação em matar células cancerosas isoladamente. Embora os primeiros experimentos de radiobiologia celular tenham produzido avanços significativos no entendimento do dano e reparo do DNA, eles não levaram em conta o impacto que os fatores locais e sistêmicos podem ter nas respostas de radiação. Ensaio clonogênicos e de formação de colônias in vitro, nos quais as curvas de mortalidade por log de radiação foram geradas pela primeira vez, mas não incluíram a compreensão do microambiente estromal e da imunidade (Thames e Withers, 1980). Assim, esses modelos clássicos nos quais os radio-oncologistas se basearam durante décadas foram insuficientes para elucidar fenômenos como a resposta abscopal (Steel, Courtenay e Peckham, 1983; Hiniker, Chen e Knox, 2012).

Evidências crescentes têm implicado o microambiente estromal como sendo um mediador crítico de respostas de radiação tanto local quanto sistemicamente. A radiação é um potente indutor de lesão vascular, inflamação e fibrose. Além disso, a hipóxia e a ativação da sinalização do fator 1 / VEGF induzida por hipóxia como resultado de disfunção vascular induzida por radiação podem promover a radiorresistência. Além disso, a irradiação coloca em movimento uma

Endereço: Rua Conde Prades, 191
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-260
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cap@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988.424

resposta inflamatória e fibrótica robusta no estroma mediada por citocinas, como IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β , que podem modificar as respostas tumorais à RXT e à quimioterapia. De fato, a radiação tem uma miríade de efeitos pleiotrópicos em tumores e seu estroma que só começam a ser compreendidos (Barker et al., 2015; Valkenburg et al., 2018).

Com o crescente reconhecimento do papel fundamental desempenhado pela sinalização imune estromal na manutenção e radiorresistência do tumor, a busca de estratégias baseadas em mecanismos para superar a resistência à RXT baseada em uma compreensão abrangente não apenas da biologia do tumor, mas também da imunobiologia estromal e sistêmica local é crucial. Historicamente, a RXT foi considerada primariamente imunossupressora. No entanto, a descoberta do efeito abscopal em vários tipos de tumores (embora raros) alterou significativamente nossa compreensão do papel do RXT no sistema imunológico. Este novo paradigma demonstra que a RXT é uma ferramenta imunomoduladora que facilita o recrutamento e ativação do sistema imunológico para combater tumores. A principal base do efeito da RXT na imunidade antitumoral é aumentar a liberação de antígenos tumorais e sua disponibilidade para células apresentadoras de antígenos (APCs) para tomar e primar células T. No entanto, RXT também tem efeitos diretos sobre o estroma circundante que permite que o sistema imunológico aumente as respostas antitumorais (Menon et al., 2019).

Como descrito anteriormente, a RXT foi inicialmente utilizada para induzir diretamente os danos no DNA, levando à morte das células tumorais (Antonia et al., 2018). Historicamente, esse mecanismo de morte por DNA foi visto como imunossupressivo devido à radiosensibilidade dos linfócitos (Trowell, 1952). No entanto, com os recentes avanços na tecnologia, incluindo a terapia de radiação estereotáxica do corpo (SBRT), que permite distribuições mais apertadas e doses mais altas, tem havido evidências crescentes de que a RXT pode ajudar a ativar células T e destruir grande parte do estroma inibitório imunológico (Menon et al., 2019).

Um resultado direto relacionado à imunidade da RXT é a liberação de antígenos tumorais, o que permite a apresentação de APC e subsequente ativação de células CD8⁺. Esta modalidade de morte celular é denominada morte celular imunogênica (CDI). Tradicionalmente, a apoptose é considerada um processo tolerogênico, que limita a capacidade do sistema imunológico de desenvolver uma resposta completa. No entanto, com o CDI, uma fonte externa de estresse facilita a liberação de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), que induzem um sinal para as APCs e instigam a morte celular. Diversos DAMPs foram implicados na via do CDI, como CRT, HMGB1 e ATP secretado (Kepp, Senovilla e Kroemer, 2014; Hernandez, Huebener e Schwabe, 2016; Wu et al., 2017).

Endereço: Rua Conde Prádo, 191

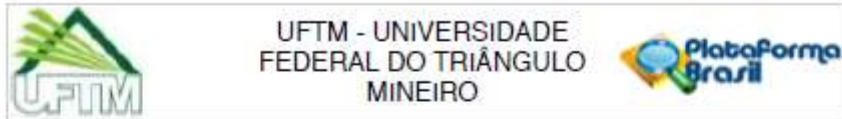
Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-260

UF: MG Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6603

E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988.424

Mesmo com o aumento da liberação de antígeno devido a RXT levando ao aumento do CDI, o TME não permite a ativação adequada da resposta imune. Por exemplo, os tumores demonstraram expressão de complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I), que leva à diminuição do reconhecimento de células tumorais pelas células T efetoras. Clinicamente, o aumento da expressão de MHC-I tem sido associado a melhora da sobrevida de múltiplos tipos de câncer (Turcotte et al., 2014, Goepfert et al., 2015). Biologicamente, isso faz sentido, pois pode ocorrer um aumento no número de reações mediadas por células T, conferindo respostas imunológicas mais fortes. A expressão reduzida de MHC-I, encontrada biologicamente e encontrada no estroma do tumor pode ser superada por RXT (Menon et al.2019). Esse estudo se justifica porque o estudo de parâmetros locais (estroma tumoral) e sistêmicos (parâmetros do hemograma e citocinas) podem levar a novas descobertas de fatores prognósticos e preditivos de resposta à Radioterapia no tratamento do câncer de colo uterino, que tem uma grande importância epidemiológica na saúde da mulher.

Objetivo da Pesquisa:

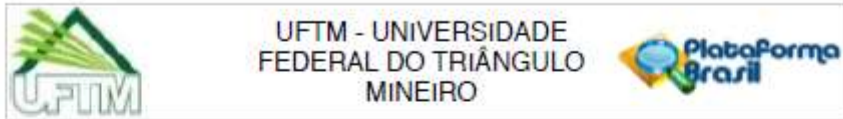
Segundo os pesquisadores:

Avaliar a associação da Radioterapia no câncer de colo uterino com o estroma tumoral e com citocinas e parâmetros laboratoriais do hemograma.

Específicos:

1. Comparar o estroma do colo (alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos) em pacientes submetidas a quimiorradioterapia por câncer de colo uterino antes e após o tratamento.
2. Comparar o estroma do colo (alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos) em pacientes submetidas a quimiorradioterapia por câncer de colo uterino antes e após o tratamento.
3. Comparar a dosagem de citocinas no soro e secreção vaginal em pacientes submetidas a quimiorradioterapia por câncer de colo uterino antes e após o tratamento.
4. Relacionar parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilo-linfócito – RNL, relação plaqueta-linfócito – RPL, RDW) com a dosagem de citocinas no soro e secreção vaginal em pacientes submetidas a quimiorradioterapia por câncer de colo uterino.
5. Relacionar parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilo-linfócito – RNL, relação plaqueta-linfócito – RPL, RDW) com a imunomarcagem estromal (alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos) em pacientes submetidas a quimiorradioterapia por câncer de colo uterino.

Endereço: Rua Conde Prados, 191
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-260
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988.424

6. Verificar se há relação entre a imunomarcagem de alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos no estroma do colo uterino e a dosagem de citocinas sistêmica e local com a persistência da lesão neoplásica após o tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Considerando que a avaliação clínica, a realização de exames laboratoriais e a coleta de biópsia de colo uterino são parte do diagnóstico e condutas terapêuticas de rotina e para o seguimento e controle de tratamento, não há riscos adicionais às pacientes referentes à pesquisa. O desconforto será da coleta de sangue e da biópsia de colo, procedimentos rápidos e pouco invasivos. Os benefícios são consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

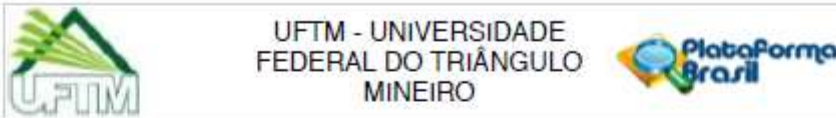
Os pesquisadores propõem realizar um estudo clínico prospectivo com 40 pacientes com diagnóstico de câncer invasivo de colo uterino com indicação de tratamento exclusivo por Quimiorradioterapia, confirmados por biópsia atendidas nos ambulatórios de Colposcopia e Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFTM, no período de 2020 a 2022. Neste estudo, antes e 90 dias após o término do tratamento, serão dosadas citocinas sistêmicas e da secreção vaginal (IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IFN-gama, TGF-beta, TNF-alfa e seus receptores), e imuno-histoquímica para verificar a imunomarcagem estromal de alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos. O grupo controle será constituído de 20 pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina, sem alterações (neoplasia ou displasia) na citologia oncológica anterior à cirurgia e sem comprometimento cervical pelo mioma.

Equipe de pesquisadores: Rosekeila Simões Nomelini (Responsável Principal), Ana Cristina Macedo Barcelos, Samela Daiere Soares Mota, Eddie Fernando Candido Murta, Sergio Santana Otano, Douglas Cobo Micheli, Beatriz Martins Tavares Murta e Adilha Misson Rua Micheletti.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados de forma adequada: 1. Autorização da GEP/HC/UFTM para a realização da pesquisa emitida por meio do Mem. nº 215/2019/GEP/HC/UFTM, datado de 02 de outubro de 2019, assinada por Gilberto de Araújo Pereira; 2. Folha de Rosto assinada no dia 23 de agosto de 2019, por Luciana A. S. Teixeira, Diretora Substituta do ICS/UFTM. Foram postados de forma adequada, na versão 3: 1. Ciência e Autorização emitida pela responsável legal da Divisão de

Endereço: Rua Conde Prados, 191
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-260
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cap@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988.424

Cuidado do HC/UFTM, Dra Ivonete Helena Rocha, datada de 29/03/2020; 2. TCLE do grupo com câncer de colo de útero e TCLE do grupo controle; e 3. Ficha de avaliação de participantes.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de análise das respostas aos Pareceres consubstanciado PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3826179.pdf emitido no dia 06/02/2020 e PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3931195.pdf emitido no dia 24/03/2020. Segundo as atribuições contidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional 001/2013, o colegiado do CEP/UFTM deliberou em reunião realizada no dia 24 de abril de 2020 pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto. Recomenda-se realizar o seguinte:

1. Adequar o TCLE. É necessário elaborar dois TCLE, um para as participantes com câncer de colo de útero, e outro para o grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina, sem alterações (neoplasia ou displasia) na citologia oncológica anterior a cirurgia e sem comprometimento cervical pelo mioma).

Foram postados os dois Termos.

1.1. Foi inserido no TCLE que será obtido das participantes com câncer de colo de útero "A coleta de biópsia já faz parte do procedimento de rotina; para a pesquisa, serão adicionados coleta de soro e a coleta de secreção vaginal."

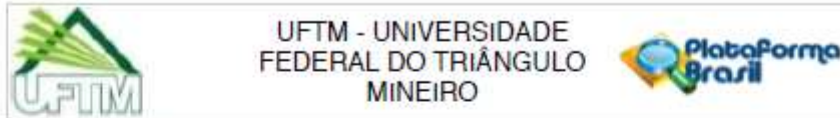
Como o recrutamento se dá em um serviço de saúde, destacamos que "É dever do pesquisador responsável, ou pessoa por ele delegada da equipe de pesquisa, explicitar, no processo de obtenção do consentimento, ao participante da pesquisa recrutado em serviço de saúde vinculado ao SUS (usuário do serviço de saúde), a diferença entre o procedimento da pesquisa e o atendimento de rotina do serviço.

Parágrafo único. O atendimento ao usuário não deverá ser prejudicado, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa, devendo essa garantia estar explícita no processo de consentimento e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) quando for o caso.", segundo a Resolução CNS nº 580 de 2018, artigo 4. Nesse sentido, solicita-se incorporar essa questão no TCLE e no processo de obtenção do consentimento.

Análise: Pendência parcialmente atendida.

RESPOSTA: Foi inserido no TCLE que será obtido das participantes com câncer de colo de útero, postado na versão 3 "É tanto a coleta de biópsia, que é um procedimento de rotina, quanto a coleta de soro e secreção vaginal, que serão procedimentos adicionados à pesquisa, comporão

| | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Endereço: Rua Conde Prados, 191 | | CEP: 38.025-260 |
| Bairro: Nossa Sra. Abadia | | |
| UF: MG | Município: UBERABA | |
| Telefone: (34)3700-6603 | | E-mail: cep@uftm.edu.br |



Continuação do Parecer: 3.988.424

informações para o estudo. Reforçamos que o seu atendimento, tratamento e seguimento não serão de forma nenhuma prejudicados, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

1.2. Foi postado o TCLE que será obtido das participantes que irão integrar o grupo controle. Não foram esclarecidos no TCLE os critérios que serão verificados nas participantes que irão integrar o grupo controle. Necessário também atender a discussão feita no item 1.1.

Análise: Pendência parcialmente atendida.

RESPOSTA: Foi inserido no TCLE que será obtido das participantes que irão integrar o grupo controle, postado na versão 3, “E tanto a coleta de Papanicolaou, que é um procedimento de rotina, quanto a coleta de sangue e biópsia do colo uterino após a retirada do útero, que será procedimento adicionado a pesquisa, comporão informações para o estudo. O grupo controle é composto de pacientes com diagnóstico de mioma uterino e Papanicolaou normal, por isso você está sendo convidada para fazer parte dessa pesquisa.” e “Reforçamos que o seu atendimento, tratamento e seguimento não serão de forma nenhuma prejudicados, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2. Postar a autorização para o recrutamento dos participantes assinada por chefia de setor/unidade superior.

Foi novamente postada a Carta submetida na versão inicial, que é assinada por pesquisadores que integram a equipe do protocolo de pesquisa. Solicita-se adequar (Resolução CNS nº 580 de 2018, Art. 1º, inc. 15) por meio de postagem de Carta assinada por dirigente que não seja membro da equipe de pesquisa evitando conflito de interesse.

Análise: Pendência não atendida.

RESPOSTA: Foi postado na versão 3, Ciência e Autorização emitida pela responsável legal da Divisão do Cuidado do HC/UFTM, Dra Ivonete Helena Rocha, datada de 29/03/2020.

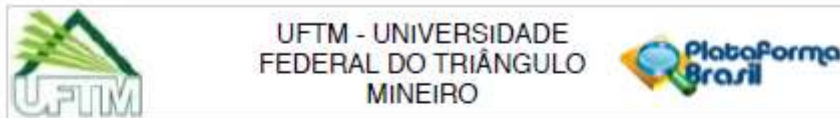
ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

3. Postar o instrumento para coleta de dados clínicos.

O instrumento não foi postado.

Análise: Pendência não atendida

Endereço: Rua Conde Prádo, 191
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-250
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988-424

RESPOSTA: Foi postado na versão 3, "INSRUMENTOCOLETADADOSCLINICOS.pdf".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

No Projeto Detalhado:

4. Suprimir um dos objetivos específicos, está repetido.

Foi realizada a supressão.

Análise: Pendência atendida.

5. Detalhar como será obtido o TCLE, local e momento.

Foi inserido no protocolo de projeto de pesquisa, versão 02, "Será obtido consentimento de todas as pacientes incluídas no estudo na data do diagnóstico no ambulatório de Oncologia Ginecológica e verificação de que a paciente se enquadra nos critérios de inclusão. Para o grupo controle, o termo de consentimento será obtido no ambulatório de pré-operatório."

Análise: Vide discussão constante no item "1" deste Parecer.

Pendência parcialmente atendida.

ANÁLISE: As inserções feitas nos TCLE dos dois grupos foram adequadas.

PENDÊNCIA ATENDIDA

6. No item 6) METODO (S) A SER(EM) UTILIZADO(S), sub item Coleta de secreção vaginal, biópsia de colo e de soro para dosagem de citocinas, consta "mediante consentimento livre e esclarecido, a coleta de secreção vaginal, BIÓPSIA DA LESÃO (destaque nosso), para diagnóstico por critérios anatomo-patológicos". Consta também "APÓS 90 DIAS DO TÉRMINO DO TRATAMENTO (destaque nosso), os procedimentos para coleta de secreção vaginal, BIÓPSIA DE COLO (destaque nosso) e coleta de soro para a dosagem de citocinas SERÃO REPETIDOS (destaque nosso)."

6.1 Esclarecer quais procedimentos fazem parte do tratamento da participante e quais serão realizados com o objetivo de pesquisa. Referidas informações devem ser inseridas no TCLE.

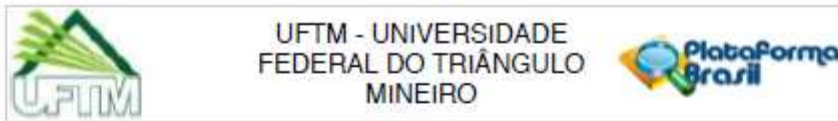
Foi inserido no protocolo de projeto de pesquisa, versão 02, "A coleta de biópsia já faz parte do procedimento de rotina para o grupo de pacientes com câncer de colo; para a pesquisa, serão adicionados coleta de soro e a coleta de secreção vaginal."

Análise: Pendência atendida.

6.2 Esclarecer quais procedimentos serão realizados nas participantes que irão integrar o grupo controle.

Foi inserido no protocolo de projeto de pesquisa, versão 02, "Para o grupo-controle, além de

Endereço: Rua Conde Prades, 191
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-260
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.958.424

coleta de soro e secreção vaginal, a biópsia também será realizada, mas sua coleta será após a retirada da peça cirúrgica – útero, evitando desconforto para a paciente (já que não é necessário biópsia de colo em pacientes com mioma uterino).”

Análise: Pendência atendida.

7. Informar como será a divulgação dos resultados para as participantes.

Foi inserido no protocolo de projeto de pesquisa, versão 02, “Para as participantes, serão divulgados os resultados diretamente às pacientes, nas consultas de seguimentos no ambulatório.”

Análise: Pendência atendida.

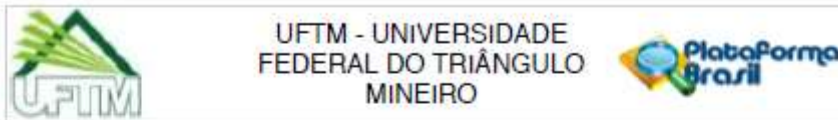
Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFTM dá-se em decorrência do atendimento à Resolução CNS nº 466 de 2012 e a Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS. Conforme prevê a legislação, são responsabilidades indelegáveis e indeclináveis, do pesquisador responsável, dentre outras: comunicar o início da pesquisa ao CEP, elaborar e apresentar os relatórios parciais (semestralmente) e final. Para isso deverá ser utilizada a opção “notificação” disponível na Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1418596.pdf | 11/04/2020 14:49:48 | | Aceito |
| Outros | RespostasassolicitacoesdoCEP.pdf | 11/04/2020 14:48:42 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Outros | INSRUMENTOCOLETADADOSCLINICOS.pdf | 11/04/2020 14:48:15 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Outros | autorizacaodivisaogestaodocuidado.pdf | 11/04/2020 14:47:22 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimentogrupocontrole.pdf | 11/04/2020 14:46:04 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimentogrupocontrole.docx | 11/04/2020 14:45:48 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / | Termodeconsentimento.docx | 11/04/2020 14:45:13 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |

Endereço: Rua Conde Prados, 191
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-250
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 3.988.424

| | | | | |
|---|---------------------------|------------------------|------------------------------|--------|
| Justificativa de Ausência | Termodeconsentimento.docx | 11/04/2020 14:45:13 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimento.pdf | 11/04/2020 14:44:41 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoCEP.pdf | 11/02/2020 06:13:57 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoCEP.docx | 11/02/2020 06:13:31 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderostoassinada.pdf | 03/10/2019 13:23:20 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

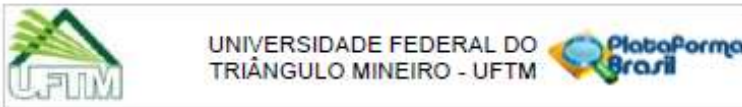
Neceesita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 24 de Abril de 2020

Assinado por:
Alessandra Cavalcanti de Albuquerque e Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Conde Prádoe, 191
Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-250
UF: MG Município: UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia

Pesquisador: Rosekela Simões Nomelini

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 22725019.2.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.487.958

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda submetida nos seguintes termos:

"Solicitamos acréscimo de um objetivo no projeto "Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia". Na verdade, esse objetivo já está implícito no projeto, já que a metodologia já prevê a coleta de material no grupo controle, mas achamos importante reforçar esse ponto.

1. Comparar, no período pré-tratamento, o estroma do colo (alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos), a dosagem de citocinas no soro e secreção vaginal e parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilo/linfócito – RNL, relação plaqueta-linfócito – RPL, RDW) em pacientes com câncer de colo avançado que serão submetidas a quimiorradioterapia (estádio maior ou igual a IIB) com os mesmos parâmetros do grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina)".

Objetivo da Pesquisa:

Consta a inclusão do seguinte objetivo:

*1. Comparar, no período pré-tratamento, o estroma do colo (alfa-actina de músculo liso e

Endereço: Av. Getúlio Vargas, nº 159, Casa das Contas
 Bairro: Abadia CEP: 38.025-440
 UF: MG Município: LIBERABÁ
 Telefone: (34)3700-8803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 5.407.358

proteína alfa de ativação de fibroblastos), a dosagem de citocinas no soro e secreção vaginal e parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilolinfócito – RNL, relação plaqueta-lymfócito – RPL, RDW) em pacientes com câncer de colo avançado que serão submetidas a quimiorradioterapia (estádio maior ou igual a IIB) com os mesmos parâmetros do grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina)*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não constam alterações em relação ao protocolo originalmente aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de solicitação de emenda submetida nos seguintes termos:

*Solicitamos acréscimo de um objetivo no projeto "Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia". Na verdade, esse objetivo já está implícito no projeto, já que a metodologia já prevê a coleta de material no grupo controle, mas achamos importante reforçar esse ponto.

1. Comparar, no período pré-tratamento, o estroma do colo (alfa-actina de músculo liso e proteína alfa de ativação de fibroblastos), a dosagem de citocinas no soro e secreção vaginal e parâmetros do hemograma (plaquetas, relação neutrófilolinfócito – RNL, relação plaqueta-lymfócito – RPL, RDW) em pacientes com câncer de colo avançado que serão submetidas a quimiorradioterapia (estádio maior ou igual a IIB) com os mesmos parâmetros do grupo controle (pacientes submetidas a histerectomia por miomatose uterina)*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatoria:

Todos os termos obrigatórios, necessários à submissão da emenda (projeto atualizado), foram adequadamente apresentados.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas nas Resoluções CNS 466/12, CNS 510/16 e Norma Operacional 001/2013, o Colegiado do CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação da emenda proposta, situação definida em reunião do dia 24/06/2022.

O CEP-UFTM reitera que, de acordo com as orientações da CONEP, o pesquisador deve notificar na

| | | | |
|-----------|--|------------|-----------------|
| Endereço: | Av. Getúlio Guerra, nº 159, Casa das Comissões | | |
| Bairro: | Abadia | CEP: | 38.025-440 |
| UF: | MG | Município: | UBERABA |
| Telefone: | (34)3700-6803 | E-mail: | cep@uftm.edu.br |



Continuação do Parecer: 5.487.308

página da Plataforma Brasil, o início do projeto. A partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestrais), assim como também é obrigatória a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado em reunião de Colegiado do CEP-UFTM em 24/06/2022.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMACOES_BASICAS_1964664_E1.pdf | 10/06/2022 09:22:39 | | Aceito |
| Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável | Emenda.pdf | 10/06/2022 08:04:47 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoCEP.docx | 10/06/2022 08:02:57 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Outros | RespostasassolicitacoesdoCEP.pdf | 11/04/2020 14:48:42 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Outros | INSRUMENTOCOLETADADOSCLINICOS.pdf | 11/04/2020 14:48:15 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Outros | autORIZACAODIVISAOGESTAODOCUIDADO.pdf | 11/04/2020 14:47:22 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimentognupocontrole.pdf | 11/04/2020 14:46:04 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimentognupocontrole.docx | 11/04/2020 14:45:48 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimento.docx | 11/04/2020 14:45:13 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termodeconsentimento.pdf | 11/04/2020 14:44:41 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderostoinassinada.pdf | 03/10/2019 13:23:20 | Rosekeila Simões Nomelini | Aceito |

Endereço: Av. Getúlio Vargas, nº 155, Casa das Comboas
 Bairro: Abadia CEP: 38.025-440
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 5.487.308

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LIBERABA, 24 de Junho de 2022

Assinado por:
Daniel Fernando Bovolenta Ovigli
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Getúlio Guarita, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia CEP: 38.025-440
UF: MG Município: LIBERABA
Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cap@uftm.edu.br

APÊNDICE A – Termo de Consentimento

Página 1 de 3



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Rua Conde Prados, 191 – Abadía – 38025-260 – Uberaba-MG – Telefone (0**34)3700-6803– E-mail: cep@uftrm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Rosekeila Simões Nomelini, Eddie Fernando Candido Murta, Adilha Misson Rua Micheletti, Beatriz Martins Tavares Murta, Douglas Côbro Micheli, Sérgio Santana Otano, Sâmela Daiere Mota)

ESCLARECIMENTO

Convidamos você a participar da pesquisa: **Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia**. O objetivo desta pesquisa é avaliar a associação da Radioterapia no câncer de colo uterino com o estroma tumoral e com citocinas e parâmetros laboratoriais do hemograma.

Sua participação é importante, pois devido minha especialidade em radioterapia posso contribuir muito para o mesmo

Caso você aceite participar desta pesquisa será necessário serão anotados dados clínicos, colposcópicos, citologia oncológica, parâmetros do hemograma e biópsia em banco de dados específico para o estudo. Os dados serão obtidos dos prontuários das pacientes. Todas as pacientes com citologia oncológica mostrando carcinoma invasivo de colo uterino serão submetidas a biópsia de colo, além de coleta do soro. Será realizada a coleta de fragmentos com a pinça de biópsia Professor Medina. No local setor de Colposcopia/Oncologia Ginecológica do Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Triângulo Mineiro com tempo estimado de coleta do soro será realizada no pré-tratamento, e 90 dias após o término do tratamento.

Os riscos desta pesquisa são: Considerando que a avaliação clínica, a realização de exames laboratoriais e a coleta de biópsia de colo uterino são parte do diagnóstico e condutas terapêuticas de rotina e para o seguimento e controle de tratamento, portanto não há riscos adicionais às pacientes referentes à pesquisa. O desconforto será da coleta de sangue e da biópsia de colo, procedimentos rápidos e pouco invasivos.

Espera-se que de sua participação na pesquisa traga ganhos e conquistas terapêuticas para outros pacientes, em consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico.

Você poderá obter quaisquer informações relacionadas a sua participação nesta pesquisa, a qualquer momento que desejar, por meio dos pesquisadores do estudo. Sua participação é voluntária, e em decorrência dela você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você não terá nenhum gasto por participar desse estudo. Você poderá não participar do estudo, ou se retirar a qualquer momento, sem que haja qualquer constrangimento junto aos pesquisadores, ou prejuízo quanto bastando você dizer ao pesquisador que lhe entregou este documento. Você não será identificado neste estudo, pois a sua identidade será de conhecimento apenas dos pesquisadores da pesquisa, sendo garantido o seu sigilo e privacidade. Você tem direito a

Este documento deverá ser emitido em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

| Rubrica do participante | Data | Rubrica do pesquisador | Data |
|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | | |



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Rua Conde Prados, 191 – Abadia – 38025-260 – Uberaba-MG – Telefone (0**34)3700-6803– E-mail: cep@uftm.edu.br

requerer indenização diante de eventuais danos que você sofra em decorrência dessa pesquisa. A perda de confidencialidade será prevenida pela utilização de números e/ou letras para identificação dos casos. As pacientes que concordarem em participar do estudo assinarão o TCLE.

Contato dos pesquisadores:

Pesquisador(es):

Nome: Sérgio Santana Otano

E-mail: sergiorxt@gmail.com

Telefone: (34) 99163-3016

Endereço: Av. Alexandre Barbosa, nº 531, casa 47, Bairro Mercês, Uberaba-MG

Em caso de dúvida em relação a esse documento, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone (34) 3700-6803, ou no endereço Rua Conde Prados, 191, Bairro Nossa Senhora da Abadia – Uberaba – MG – de segunda a sexta-feira, das 08:00 às 11:30 e das 13:00 às 17:30. Os Comitês de Ética em Pesquisa são colegiados criados para defender os interesses dos participantes de pesquisas, quanto a sua integridade e dignidade, e contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos.

CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

TÍTULO DA PESQUISA: Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e a quais procedimentos serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará a qualidade do atendimento e/ou tratamento que estou recebendo. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para

Este documento deverá ser emitido em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

| Rubrica do participante | Data | Rubrica do pesquisador | Data |
|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | | |



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
 Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Rua Conde Prados, 191 – Abadia – 38025-260 – Uberaba-MG – Telefone (0**34)3700-6803– E-mail: cep@uftm.edu.br

participar do estudo. Concordo em participar do estudo, **Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia**, e receberei uma via assinada deste documento.

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

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável
 Rosekeila Simões Nomelini
 (34) 98823-8442

Assinatura do pesquisador assistente
 Sérgio Santana Otano
 E-mail: sergiorxt@gmail.com
 (34) 99163-3016

Este documento deverá ser emitido em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

| Rubrica do participante | Data | Rubrica do pesquisador | Data |
|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | | |

APÊNDICE B – Termo de Consentimento

Página 1 de 3



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Ministério da Educação

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Rua Conde Prados, 191 – Abadia – 38025-260 – Uberaba-MG – Telefone (0**34)3700-6803– E-mail: cep@uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE

ESCLARECIMENTO

Convidamos você a participar da pesquisa: **Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia**. O objetivo desta pesquisa é avaliar a associação da Radioterapia no câncer de colo uterino com o estroma tumoral e com citocinas e parâmetros laboratoriais do hemograma.

Sua participação é importante, pois novas descobertas poderão ser realizadas a médio e longo prazo no tratamento dessa doença.

Caso você aceite participar desta pesquisa, você será incluído no grupo controle e será necessário ser submetida a coleta de Papanicolaou e coleta de sangue antes da cirurgia de retirada do útero. Será realizado, ainda, coleta de biópsia do colo uterino após a retirada do órgão, e portanto não trará desconforto ou dor. E tanto a coleta de Papanicolaou, que é um procedimento de rotina, quanto a coleta de sangue e biópsia do colo uterino após a retirada do útero, que será procedimento adicionado à pesquisa, comporão informações para o estudo. O grupo controle é composto de pacientes com diagnóstico de mioma uterino e Papanicolaou normal, por isso você está sendo convidada para fazer parte dessa pesquisa.

Não há riscos substanciais, considerando que a avaliação clínica e a realização de exames laboratoriais são parte do diagnóstico e condutas terapêuticas de rotina e para o seguimento e controle de tratamento. Como a coleta de biópsia do colo uterino será realizada após a retirada do órgão, não trará nenhum desconforto ou dor. Reforçamos que o seu atendimento, tratamento e seguimento não serão de forma nenhuma prejudicados, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa.

Espera-se que de sua participação na pesquisa traga ganhos e conquistas terapêuticas para outros pacientes, em consequência da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e identificação de fatores relacionados ao prognóstico.

Você poderá obter quaisquer informações relacionadas a sua participação nesta pesquisa, a qualquer momento que desejar, por meio dos pesquisadores do estudo. Sua participação é voluntária, e em decorrência dela você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você não terá nenhum gasto por participar desse estudo. Você poderá não participar do estudo, ou se retirar a qualquer momento, sem que haja qualquer constrangimento junto aos pesquisadores, ou prejuízo quanto bastando você dizer ao pesquisador que lhe entregou este documento. Você não será identificada neste estudo, pois a sua identidade será de conhecimento apenas dos pesquisadores da pesquisa, sendo garantido o seu sigilo e privacidade. Você tem direito a requerer indenização diante de eventuais danos que você sofra em decorrência dessa pesquisa. A perda de confidencialidade será prevenida pela utilização de números e/ou letras para identificação dos casos. As pacientes que concordarem em participar do estudo assinarão o TCLE.

Pesquisador(es):

Nome: Sérgio Santana Otano; E-mail: sergiorxt@gmail.com

Telefone: (34) 99163-3016. End: Av. Alexandre Barbosa, nº 531, casa 47, Bairro Mercês, Uberaba

Este documento deverá ser emitido em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

| Rubrica do participante | Data | Rubrica do pesquisador | Data |
|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | | |



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Ministério da Educação

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Rua Conde Prados, 191 – Abadia – 38025-260 – Uberaba-MG – Telefone (0**34)3700-6803– E-mail: cep@uftm.edu.br

Em caso de dúvida em relação a esse documento, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone (34) 3700-6803, ou no endereço Rua Conde Prados, 191, Bairro Nossa Senhora da Abadia – Uberaba – MG – de segunda a sexta-feira, das 08:00 às 11:30 e das 13:00 às 17:30. Os Comitês de Ética em Pesquisa são colegiados criados para defender os interesses dos participantes de pesquisas, quanto a sua integridade e dignidade, e contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos.

CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

TÍTULO DA PESQUISA: Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e a quais procedimentos serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará a qualidade do atendimento e/ou tratamento que estou recebendo. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo. Concordo em participar do estudo, **Alterações do estroma em pacientes com câncer de colo uterino submetidas a Quimiorradioterapia**, e receberei uma via assinada deste documento.

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

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador assistente

Este documento deverá ser emitido em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

| Rubrica do participante | Data | Rubrica do pesquisador | Data |
|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | | |



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
 Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Rua Conde Prados, 191 – Abadia – 38025-260 – Uberaba-MG – Telefone (0**34)3700-6803– E-mail: cep@uftm.edu.br

Rosekeila Simões Nomelini
 (34) 98823-8442

Sérgio Santana Otano
 E-mail: sergiorxt@gmail.com
 (34) 99163-3016

Este documento deverá ser emitido em duas vias, uma para o participante e outra para o pesquisador.

| Rubrica do participante | Data | Rubrica do pesquisador | Data |
|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | | |

APÊNDICE C – Descrição dos Anticorpos

DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NA IMUNO- HISTOQUÍMICA DO ESTUDO

| Anticorpos | Especificação | Tampão/pH | Diluição | Controles Positivos |
|-----------------|--|-------------------------|--|---|
| FAP | Anti-Fibroblast activation protein, alpha antibody – ab53066 Nova Analitica Imp e Exp LTDA Nova Analitica Imp e Exp LTDA. | Citrato 10mM/ pH 6,0 | Lyophilized from 100 µl of a 0.2µm filtered solution in PBS pH 7.4 / Reconstitute at 0.5 mg/mL in sterile PBS | Tecido de câncer de mama humano |
| α-Actina | Humanα-Smooth Muscle Actin N-terminal Synthetic Decapeptide Antibody / Monoclonal Mouse IgG _{2A} Clone # 1A4 / Lot: IBR0213121 R&D Systems, Inc. | Tris-DTA/ pH 9.0 | 1:100 | Tecido de coração humano / Tecido de câncer de mama humano |

Fonte: Do Autor, 2022

APÊNDICE D – Artigo Submetido**Peritumoral stroma and systemic inflammatory response
in advanced cervical cancer**

Sérgio Santana Otano¹, Anelise Mendes Melo¹,
Fernanda Beatriz Ferreira Souza¹, Jéssica Souto Morlin¹,
Eliângela de Castro Côbo², Ana Cristina Macêdo Barcelos¹,
Adilha Misson Rua Micheletti², Millena Prata Jammal¹,
Eddie Fernando Candido Murta¹, Rosekeila Simões Nomelini¹

¹Department of Gynecology and Obstetrics; Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, Brazil; ²Discipline of Special Pathology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba - MG, Brazil

Address for correspondence: Prof. Rosekeila Simões Nomelini, Research Institute of Oncology (IPON)/Department of Gynecology and Obstetrics, UFTM, Av. Getúlio Guaritá, s/n, Bairro Abadia, 38025-440. Uberaba-MG, Brazil.

Phone: +55 (34) 3318-5326 Fax: +55 (34) 3318-5342

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6591-7619>

e-mail: rosekeila@terra.com.br

ABSTRACT

Objectives: The objectives of the study were to compare the cervical stroma in patients with advanced cervical cancer with the control group; to compare, in the pre-treatment period, blood count parameters (platelets, neutrophil-lymphocyte ratio - NLR, platelet-lymphocyte ratio - PLR, RDW) in patients with advanced cervical cancer (stage \geq IIB) with the same parameters as control group; and in cervical cancer, to verify if there is an association of immunostaining of stromal markers with pathological and systemic prognostic factors.

Methods: We prospectively evaluated 16 patients diagnosed with advanced invasive cervical cancer (stage \geq IIB), confirmed by biopsy. A control group of 22 patients was used (patients undergoing hysterectomy for uterine leiomyoma). Immunohistochemistry was performed to verify the stromal immunostaining of SMA (alpha-smooth muscle actin) and FAP (fibroblast activation protein alpha) in cervical biopsy of patients and the control group. Immunostainings were compared between groups using Fisher's exact test. The results of the hemogram parameters were compared using the Mann-Whitney Test. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results: Strong FAP immunostaining (2/3) was more frequent in patients with cervical cancer when compared with patients with myoma ($p=0.0005$). Regarding SMA, strong immunostaining (2/3) was also found more in the group of cancer patients compared to the group of patients with myoma ($p < 0.00001$). The NLR values were higher in the cancer patient group compared to the control group ($p=0.0019$). Regarding the PLR values, these were also higher in the cancer group than in the leiomyoma group, but at the threshold of significance ($p=0.0675$). There was no significant difference in the evaluation of the two stromal markers in cervical cancer in the study of pathological prognostic factors (staging and histological grade) nor in the study of systemic factors.

Conclusion: Strong FAP and SMA immunostaining (2/3) were found more in the group of patients with cervical cancer when compared to the control group. The NLR values were also higher in the group of cancer patients.

Keywords: Cervical cancer, alpha-smooth muscle actin, fibroblast activation protein alpha, stroma, blood count parameters.

INTRODUCTION

Currently, cancer is the main public health problem in the world and is among the four main causes of premature death in most countries. The incidence and mortality from this disease have been increasing, due to aging, population growth, as well as changes in the distribution and prevalence of risk factors, especially those associated with socioeconomic development (Bray et al., 2018).

The tumor stroma has several cells, in addition to the extracellular matrix, that can suppress the host's immune responses against the tumor cells. Through the secretion of immunosuppressive cytokines, metabolic changes and other mechanisms, the tumor stroma provides a complex network of safeguards for tumor proliferation (Menon et al., 2019).

The tumor microenvironment is composed of a complex network of extracellular matrix and cells such as cancer-associated fibroblasts (CAFs), blood vessel associated smooth muscle cells, pericytes, endothelial cells, mesenchymal stem cells and a variety of immune cells. Changes in the homeostasis of this environment contribute to tumor growth, angiogenesis, metastasis, immune suppression and resistance to treatments (Zeltz et al., 2020).

Studies suggest that two stromal markers, FAP and SMA, play an important role in the stroma of malignant ovarian neoplasm. Stronger FAP immunostaining was found in ovarian cancer compared with benign ovarian neoplasms. In ovarian cancer, immunostaining plus FAP was higher in moderately differentiated and undifferentiated ovarian carcinomas compared to well-differentiated tumors, demonstrating that FAP may play a role in the prognostic prognosis. SMA is expressed in smooth muscle cells of the vasculature and it is the most widely used marker for identifying myofibroblasts. In an immunohistochemical study of ovarian neoplasms, detection of SMA alone has not consistently provided significant results (Da Silva et al. 2018; Da Silva et al., 2020).

The objectives of the study were to compare the cervical stroma in patients with advanced cervical cancer with the control group; to compare, in the pre-treatment period, blood count parameters (platelets, neutrophil-lymphocyte ratio - NLR, platelet-lymphocyte ratio - PLR, RDW) in patients with advanced cervical cancer (stage \geq IIB) with the same parameters as control group; and in cervical cancer, to verify if there is an association of immunostaining of stromal markers with pathological (histological type, histological grade and staging) and systemic (platelets, NLR, PLR and RDW) prognostic factors.

MATERIALS AND METHODS

We prospectively evaluated 16 patients diagnosed with advanced invasive cervical carcinoma [\geq IIB – FIGO (Bhatla et al., 2018)], confirmed by biopsy, attended at the Colposcopy and Gynecological Oncology outpatient clinics of the Department of Gynecology and Obstetrics from UFTM, from 2020 to 2022. Clinical data, oncotic cytology, blood count parameters (neutrophils, lymphocytes, platelets, RDW) and biopsy data were recorded in a specific database for the study. A control group of 22 patients was used.

The inclusion criterion was women with invasive cervical cancer staging \geq IIB. Exclusion criteria were pregnancy, other diseases that lead to immunosuppression, use of immunosuppressive drugs and relapse.

Data were obtained from the patients' medical records. All patients with Pap smear showing invasive cervical carcinoma underwent cervical biopsy. Staging was performed through clinical and imaging exams. Patients with a stage \geq IIB were selected for the study. The control group consisted of 22 patients who underwent hysterectomy for uterine leiomyoma, without alterations (neoplasia or dysplasia) in Pap smear prior to surgery and without cervical involvement by the myoma.

The calculation of the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) was performed by dividing the absolute number of neutrophils by the absolute number of lymphocytes. The calculation of the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) was performed by dividing the absolute number of platelets by the absolute number of lymphocytes. Immunohistochemistry was performed to verify stromal immunostaining of SMA and FAP in cervical cancer and control group.

Consent was obtained from all patients included in the study and from all patients in the control group. The study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of UFTM under CAAE 22725019.2.0000.5154, number 3.988.424.

Cervical biopsy collection

Cervical biopsies were stored in formaldehyde and sent to the Special Pathology Department. Biopsy collection is already a routine procedure for the group of patients with cervical cancer. For the control group, the biopsy was performed immediately after the removal of the surgical specimen (uterus), avoiding discomfort for the patient (since a cervical biopsy is not necessary in patients with uterine leiomyoma).

Immunohistochemistry Study.

Specimens obtained by surgical resection were processed in paraffin and reviewed by an experienced pathologist. The selected cases were submitted to new cuts (4 μm) on silanized slides (ATPS - Silane, Sigma® A3648), using the streptavidin-biotin-peroxidase technique. The slides will remain in an oven (56°C, 24 h) and then they will be deparaffinized (3 baths in xylene, 5 min each) and dehydrated (3 baths in absolute alcohol and 1 bath in 80% alcohol, 10 sec each). Afterwards, the slides remained in a bath (PBS, pH 7.2, 5 min) for hydration. Excess buffer was removed and the cut edge blotted with absorbent paper. Hydrogen peroxide (3%, 10 min) was added to the slides over each cut to block endogenous peroxidase and then washed in PBS.

For antigen recovery, the slides were placed in tubes containing 10 mM citrate buffer solution (pH 6.0) or Tris-EDTA. The tubes were then placed in a pot filled with distilled water at 100 °C up to the indicated limit. After 30 min, the tubes were placed on a bench to cool to an ambient temperature (22 °C).

Immunohistochemical staining was performed with the Novolink™ Polymer Detection System (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA). Briefly, the slides were first washed with distilled water and dried carefully to prevent the sections completely drying out. The slides were then incubated with Peroxidase Block (3% hydrogen peroxide) for 5 min and washed 3× in PBS buffer (5 min each). After a 5 min incubation step with Protein Block, the slides were washed 3× in PBS buffer (5 min each) and then incubated with the specific primary antibody (anti- α SMA, anti-FAP) that were diluted in 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma®) according to the manufacturer's indications.

Stainings were performed in a humid chamber at 4 °C for durations recommended by the manufacturer. In addition, staining of positive controls was performed for each antibody, according to the manufacturer's directions. After the slides were washed with PBS buffer (5 min each), the slides were incubated with Post Primary Block for 30 min, washed with PBS buffer (5 min each), then incubated with Novolink™ Polymer. After 30 min, the slides were washed with PBS buffer (5 min each) and developed with DAB Chromogen and Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer). After 5 min, the slides were washed in running water and counterstained in Harris' hematoxylin. As a final step, the slides were immersed in three baths of absolute alcohol (10 sec each), to remove excess water; one bath of phenylated xylol; and three baths of xylol (5 min each).

A coverslip was mounted on each slide with Entellan (–) and two observers evaluated the slides. The intensity of immunostaining in the stroma was subjectively assessed using 0 to

3: 0 (no staining), 1 (weak staining), 2 (moderate staining), 3 (strong staining). Figure 1 shows the immunostaining of cases (figure 1) and controls (figure 2).

Statistical analysis

Data were analyzed by GraphPad Prism software. Results were expressed as medians, minimum and maximum values. The immunostaining of stromal markers were compared between groups using Fisher's exact test. The results of blood count parameters were compared between groups using the Mann-Whitney Test. Differences will be considered significant for $p < 0.05$.

In the immunohistochemical study, the agreement between two observers will be performed using the kappa: $\kappa < 0.4$: weak agreement; $0.4 \leq \kappa < 0.8$: moderate agreement; $0.8 \leq \kappa < 1.0$: strong agreement; $\kappa = 1.0$: perfect agreement.

RESULTS

The general characteristics and parameters of the blood count of the groups of patients with cervical cancer and uterine leiomyoma are shown in Table 1. The histological type, histological grade and staging of the patients in the cervical cancer group are shown in Table 2.

The NLR values were higher in the group of cancer patients (median=4.4; minimum=2.06; maximum=47.48) compared to the control group (median=2.32; minimum=0.82; maximum= 8.29) ($p=0.0019$). Regarding the RPL values, these were also higher in the cancer group (median=200.7; minimum=123.14; maximum=748.13) than in the leiomyoma group (median=164.6; minimum=78, 99; maximum=263.33), but at the threshold of significance ($p=0.0675$). There was no significant difference in platelet and RDW values when comparing these groups ($p=0.3986$ and $p=0.9095$, respectively) (figure 3).

Strong immunostaining (2/3) by FAP was more frequent in patients with cervical cancer when compared with patients with myoma (control group) ($p=0.0005$). Regarding SMA, strong immunostaining (2/3) was also found more in the group of cancer patients compared to the group of patients with myoma ($p < 0.00001$) (Table 3).

The NLR values were higher in the group of cancer patients (median=4.4; minimum=2.06; maximum=47.48) compared to the control group (median=2.32; minimum=0.82; maximum= 8.29) ($p=0.0019$). Regarding the RPL values, these were also

higher in the cancer group (median=200.7; minimum=123.14; maximum=748.13) than in the leiomyoma group (median=164.6; minimum=78, 99; maximum=263.33), but at the threshold of significance ($p=0.0675$). There was no significant difference in platelet and RDW values when comparing these groups ($p=0.3986$ and $p=0.9095$, respectively) (figure 3).

There was no significant difference in the evaluation of the two stromal markers in cervical cancer in the study of pathological prognostic factors (staging and histological grade) nor in the study of systemic factors (platelets, NLR, PLR and RDW).

DISCUSSION

To decide the line of treatment to follow for cancer, prognostic factors are very important. Tumor stroma contains distinct prognostic data evidenced by vascular cells and immune cells in the movement of neoplastic progression. The FAP and SMA markers were evaluated in cervical cancer (in the stromal microenvironment), and several studies have been carried out showing that fibroblast behavior and characteristics influence therapeutic responses. The presence of immunostaining for SMA in the cancer cell is responsible for creating a permissive environment for tumor progression (Wu et al., 2008). Such a relationship is evident when it is possible to observe that almost all patients with invasive cervical carcinoma present immunostaining for SMA, while none of the patients with intraepithelial carcinomas or normal cells have such staining. Thus, there is a strong relationship between the association of the transformation of cervical intraepithelial neoplasia into invasive carcinoma (Li et al., 2009; Xiao et al., 2021). This reinforces our result, since in the present study, strong immunostaining (2/3) for SMA was found more in the group of cancer patients when compared to the group of patients with myoma.

The strong immunostaining by FAP (2/3) of the present study was elevated in cancer cells when compared to normal cells. It is known that this biomarker has a potential therapeutic target, but its expression does not correlate with clinical results, thus not having a relationship with the prognosis of cervical cancer in treatment-naïve patients. However, its present labeling can be used for targeted therapy or imaging (Sun L, et al, 2022). FAP emerged as a specific marker of reactive fibroblasts in tumors. It is highly expressed in reactive stromal fibroblasts in epithelial carcinomas. FAP contributes to neovascularization within tumors, in addition to increasing tumorigenicity (Lai et al., 2012). In this study, strong FAP immunostaining occurred more frequently in the group of patients with cervical cancer.

In addition to the degradation of the basement membrane, the invasion of cervical cancer is carried out by the remodeling of the interstitial stroma. Thus, some proteins and fibroblasts play an important role in the pathogenesis of cervical cancer (Fullár A et al., 2015). FAP is an immunohistochemical marker with a potential therapeutic target in several types of gynecological and genitourinary carcinoma, but which did not show much prognostic significance in untreated cervical cancer, as its expression did not correlate with clinical outcomes. However, it has been shown that FAP may have utility in cervical neoplasia in targeted therapy (Sun L et al., 2022). In our study, there was no significant difference in the assessment of the two stromal markers in cervical cancer in the study of pathological prognostic factors (staging and histological grade) or in the study of systemic factors (platelets, NLR, PLR and RDW).

According to Huang et al. (2019), the tumor microenvironment has been receiving more attention in recent years. Various inflammatory cells are important components of the tumor microenvironment. Neutrophils, lymphocytes, platelets and acute phase proteins contribute to the inflammatory response and can be detected through a blood count (Huang et al., 2019).

Inflammation plays an important role in the initiation and progression of many cancers, including cervical cancer. Currently, the correlation between blood factors, easily identified by a blood count, and the prognosis and risk of dissemination in cervical cancer is known. The most studied are NLR, PLR, RDW and the isolated platelet count, used in this study. Studies show that in advanced cervical cancer higher values of NLR and PLR were found when compared to early stages (Lima et al., 2020). High NLR is associated with lower overall survival and disease-free survival, and can be considered an independent factor of worse prognosis (Lima et al., 2020) and is a biomarker to predict the development of cervical intraepithelial neoplasia (Xu et al., 2021). Our study corroborates this information, since the NLR values were higher in patients with malignant neoplasia than in the control group.

Regarding PLR, it is an independent risk factor for increased lymph node metastases, acting as a prognostic factor, especially if combined with NLR (Chen et al., 2016). In the present study, higher values of PLR were also found in patients with neoplasm when compared to the control group, despite being at the limit of significance. Thus, the PLR together with the high NLR seem to provide an increased risk for the development of cervical neoplasia. Platelet count and RDW were not relevant in the present study, although the increase in RDW in cervical cancer has already been described (Kose et al., 2015) and the consideration of thrombocytosis as a pre-treatment prognostic factor (Kozasa et al., 2017).

Inflammation plays a fundamental role in tumorigenesis and in the advancement of colon cancer. In the present study we focused on determining the predictive significance of the inflammation marker RDW, but there was no significant difference in values when comparing the study groups. RDW is traditionally used for the differential diagnosis of microcytic anemia, being recently proposed as a marker of systemic inflammation for chronic inflammatory diseases (Wang et al., 2017). In addition, cancer patients have higher RDW values compared to healthy patients. Another feature is that elevated RDW is associated with cancer stage and histopathological features. In the present study, we did not detect a significant difference in platelet and RDW values, which may suggest that the biological role of RDW in cervical cancer may differ for other cancers.

Some limitations also exist in our study. The main limitation is the small sample size of patients. However, despite the limitation, our study was the first in the literature to compare stromal markers and blood count parameters with a control group of patients with uterine leiomyoma, and may be a target for new studies related to carcinogenesis and new treatments for this disease, whose Morbimortality still has so much impact, especially in developing countries. In addition, our results may have potential in future studies on the relationship between the stroma and the systemic inflammatory response, bearing in mind that the blood count is a simple, inexpensive, and easy-to-collect test.

CONCLUSION

Strong immunostaining (2/3) by FAP and SMA were found more in the group of patients with cervical cancer when compared to the group of patients with myoma. The RNL values were higher in the cancer patient group when compared to the control group. Regarding the RPL values, these were also higher in the cancer group than in the leiomyoma group, but at the threshold of significance. There was no significant difference in platelet and RDW values when comparing these groups. There was also no difference in the evaluation of the 2 stromal markers in cervical cancer in the study of pathological prognostic factors (staging and histological grade) nor in the study of systemic factors (platelets, NLR, PLR and RDW).

CONFLIT OF INTEREST STATEMEN

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the funding received from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FUNEPU (Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil).

REFERENCES

- Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2018 Oct;143 Suppl 2:22-36. doi: 10.1002/ijgo.12611.
- Bray Li Q, Huang W, Zhou X. Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor-beta1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the cervix. *J Int Med Res.* 2009 Mar-Apr;37(2):446-54. doi: 10.1177/147323000903700220.
- Bougherara H, Mansuet-Lupo A, Alifano M, Ngo C, Damotte D, Le Frere-Belda MA, et al. Real-Time Imaging of Resident T Cells in human lung and ovarian carcinomas reveals how different tumor microenvironments control T lymphocyte migration. *Front Immunol.* (2015) 6:500.
- Chen L, Zhang F, Sheng X, Zhang S, Chen Y, Liu B. Peripheral platelet/lymphocyte ratio predicts lymph node metastasis and acts as a superior prognostic factor for cervical cancer when combined with neutrophil Lymphocyte. *Diagnostic Accuracy Study, Medicine,* (2016) 95:32.
- Da Silva AC, Jammal MP, Etchebehere RM, Murta EFC, Nomelini RS. Role of alpha-smooth muscle actin and fibroblast activation protein alpha in ovarian neoplasms. *Gynecol Obstet Invest.* 2018, 83:381–87.
- Da Silva AC, Jammal MP, Crispim PCA, Murta EFC, Nomelini RS. The Role of Stroma in Ovarian Cancer. *Immunol Invest.* 2020 May;49(4):406-424. doi: 10.1080/08820139.2019.1658770.
- Fullár A, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, Sobel G, et al. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer* (2015) 15:256.
- Huang H, Liu Q, Zhu L, Zhang Y, Lu X, Wu Y, et al. Prognostic Value of Preoperative Systemic Immune-Inflammation Index in Patients with Cervical Cancer. *Scientific Reports* (2019) 9:3284.
- Kose M, Celik F, Kose SK, Arioz DT, Yilmazer M. Could the platelet-to-lymphocyte ratio be a novel marker for predicting invasiveness of cervical pathologies? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(3):923-6. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.3.923. PMID: 25735383

- Kozasa K, Mabuchi S, Komura N, Yokoi E, Hiromasa K, Sasano T, Kawano M, Matsumoto Y, Kobayashi E, Kimura T. Comparison of clinical utilities of the platelet count and platelet-lymphocyte ratio for predicting survival in patients with cervical cancer: a single institutional study and literature review. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(33):55394-55404. doi: 10.18632/oncotarget.19560.
- Lai D, Ma Li, Wang F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. *International Journal of Oncology* . Volume 41 Issue 2 , August 2012.
- LI Q, Huang W, Zhou X. Expression of CD34, α Smooth Muscle Actin and Transforming Growth Factor- β 1 in Squamous Intraepithelial Lesions and Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *The Journal of International Medical Research*. 2009; 37: 446 – 454.
- Lima PSV, Mantoani PTS, Murta EFC, Nomelini RS. Laboratory parameters as predictors of prognosis in uterine cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021 Jan;256:391-396. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.11.044.
- Lima PSV, Mantoani PTS, Murta EFC, Nomelini RS. Laboratory parameters as predictors of prognosis in uterine cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021 Jan;256:391-396. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.11.044.
- Menon H, Ramapriyan R, Cushman TR, Verma V, Kim HH, Schoenhals JE, Atalar C, Selek U, Chun SG, Chang JY, Barsoumian HB, Nguyen Q-N, Altan M, Cortez MA, Hahn SM and Welsh JW (2019) Role of Radiation Therapy in Modulation of the Tumor Stroma and Microenvironment. *Front. Immunol*. 10:193.
- Sun L, Schroeder MC, Hagemann IS, Pfeifer JD, Schwarz JK, Grigsby PW, Markovina S, Lin AJ. Expression of Potential Biomarker Targets by Immunohistochemistry in Cervical Carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2022.
- Thames HDJr, Withers HR. Test of equal effect per fraction and estimation of initial clonogen number in microcolony assays of survival after fractionated irradiation. *Br J Radiol*. (1980) 53:1071–7.
- Trowell OA. The sensitivity of lymphocytes to ionising radiation. *J Pathol Bacteriol*. (1952) 64:687–704.
- Turcotte S, Katz SC, Shia J, Jarnagin WR, Kingham TP, Allen P, et al. Tumor MHC class I expression improves the prognostic value of T cell density in resected colorectal liver metastases. *Cancer Immunol Res*. (2014) 2:530–7.
- Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. (2018) 15:366–81.
- Wang L, Jia J, Lin L, Guo J, Ye X, Zheng X, et al. Predictive value of hematological markers of systemic inflammation for managing cervical cancer. *Clinical Research Paper*. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 27), pp: 44824-44832.

Wu MP, Young MJ, Tzeng CC, Tzeng CR, Huang KF, Wu LW, Chou CY. A novel role of thrombospondin-1 in cervical carcinogenesis: inhibit stroma reaction by inhibiting activated fibroblasts from invading cancer. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1115-2

Xiao L, Zhu H, Shu J, Gong D, Zheng D, Gao J. Overexpression of TGF- β 1 and SDF-1 in cervical cancer-associated fibroblasts promotes cell growth, invasion and migration. *Arch Gynecol Obstet*. 2022 Jan;305(1):179-192.

Xu L, Song J. Elevated neutrophil-lymphocyte ratio can be a biomarker for predicting the development of cervical intraepithelial neoplasia. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Jul 16;100(28):e26335. doi: 10.1097/MD.00000000000026335.

Zeltz C, Primac I, Erusappan P, Alam J, Noel A, Gullberg D. Cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors: emerging role of integrins. *Semin Cancer Biol*. 2020 May;62:166-181. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.004.

Legend of figures

Figure 1: 1A – Photomicrograph of cervical biopsy with well-differentiated invasive squamous cell carcinoma (HE, 40x). 1B – Photomicrograph of the anterior biopsy demonstrating in the stroma muscle fibers positive for SMA 3+/3 (SMA, 40x). 1C – Photomicrograph of the previous biopsy showing fibroblasts positive for FAP 3+/3 (anti-FAP, 40x) in the stroma. 1D – Photomicrograph of cervical biopsy showing moderately differentiated invasive squamous cell carcinoma (HE, 40x). 1E – Photomicrograph of the anterior biopsy demonstrating in the stroma muscle fibers positive for SMA 2+/3 (SMA, 40x). 1F – Photomicrograph of the previous biopsy showing fibroblasts positive for FAP 3+/3 (anti-FAP, 40x) in the stroma.

Figure 2: 2A – Photomicrograph of cervical biopsy with mild nonspecific cervicitis (HE, 20x). 2B - Photomicrograph of the previous biopsy showing muscle fibers and small capillaries positive for SMA 1+/3 (SMA, 40x) in the stroma. 2C – Photomicrograph of the previous biopsy showing fibroblasts and small capillaries in the stroma that were not positive for FAP 2+/3 (anti-FAP, 40x). 2D – Photomicrograph of cervical biopsy demonstrating the stroma with small capillaries without alterations (HE, 20x). 2E – Photomicrograph of the anterior biopsy showing positive muscle fibers and capillaries in the stroma for SMA 2+/3 (SMA, 40x). 2F – Photomicrograph of the previous biopsy demonstrating positive fibroblasts and capillaries in the stroma for FAP 1+/3 (anti-PAF, 40x).

Figure 3: NLR in patients with cervical cancer and leiomyomas (p=0.0019); PLR in patients with cervical cancer and leiomyomas (p=0.0675); absolute value of platelets (/mm³)

in patients with cervical cancer and leiomyomas ($p=0.3986$); RDW in patients with cervical cancer and leiomyomas ($p=0.9095$).

Table 1: General characteristics and blood count parameters of groups of patients with cervical cancer and uterine myoma, Uberaba-MG, 2020-2022 (median, minimum and maximum, or n and percentage).

| | Cervical cancer n = 16 | Leiomyoma n = 22 |
|---|---------------------------|----------------------|
| Age (years) | 50 (26-67) | 46 (41-55) |
| Parity (births) | 1 (3-6) | 2 (0-5) |
| Hormonal status | | |
| Menacme | 7 (43,75%) | 22 (100%) |
| Menopause | 9 (56,25%) | 0 (0%) |
| Platelets ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | 281,5 (174-903) | 321(98-497) |
| NLR | 4,4 (2,06-47,48) | 2,32 (0,82-8,29) |
| PLR | 200,7 (123,14-748,13) | 164,6 (78,99-263,33) |
| RDW | 13,85 (13-23,6) | 14 (12,6-23,3) |

Source: Prepared by the author, 2022

Table 2: Characteristics of the group of patients with cervical cancer regarding histological type, histological grade and staging, Uberaba-MG, 2020-2022 (median, minimum and maximum, or n and percentage).

| | n | % |
|--------------------|----|-------|
| Histological type | | |
| Epidermoid | 15 | 93,75 |
| Non-epidermoid | 1 | 6,25 |
| Histological grade | | |
| Grade 1 | 5 | 31,25 |
| Grade 2 | 8 | 50 |
| Grade 3 | 3 | 18,75 |
| Staging (FIGO) | | |
| IIB | 5 | 31,25 |
| IIIA | 1 | 6,25 |
| IIIB | 7 | 43,75 |
| IIIC1 | 1 | 6,25 |
| IIIC2 | 0 | 0 |
| IVA | 2 | 12,5 |

| | | |
|-----|---|---|
| IVB | 0 | 0 |
|-----|---|---|

Source: Prepared by the author, 2022

Table 3: FAP immunostaining in cervical cancer and uterine leiomyoma, Uberaba-MG, 2020-2022.

| | FAP (0 / 1) | FAP (2 / 3) | p |
|------------------------|-------------|-------------|--------|
| Leiomyoma (n=22) | 14 (63,64%) | 8 (36,36%) | |
| Cervical cancer (n=17) | 1 (5,88%) | 16 (94,12%) | 0,0005 |

Source: Prepared by the author, 2022

Fisher's exact test, with a significance level lower than 0.05.

Table 4: SMA immunostaining in cervical cancer and uterine leiomyoma, Uberaba-MG, 2020-2022.

| | SMA (0 / 1) | SMA (2 / 3) | p |
|------------------------|-------------|-------------|-----------|
| Leiomyoma (n=22) | 86,36 (%) | 3 (13,64%) | |
| Cervical cancer (n=17) | 0 (0%) | 17 (100%) | < 0.00001 |

Source: Prepared by the author, 2022

Fisher's exact test, with a significance level lower than 0.05.

Figure 1

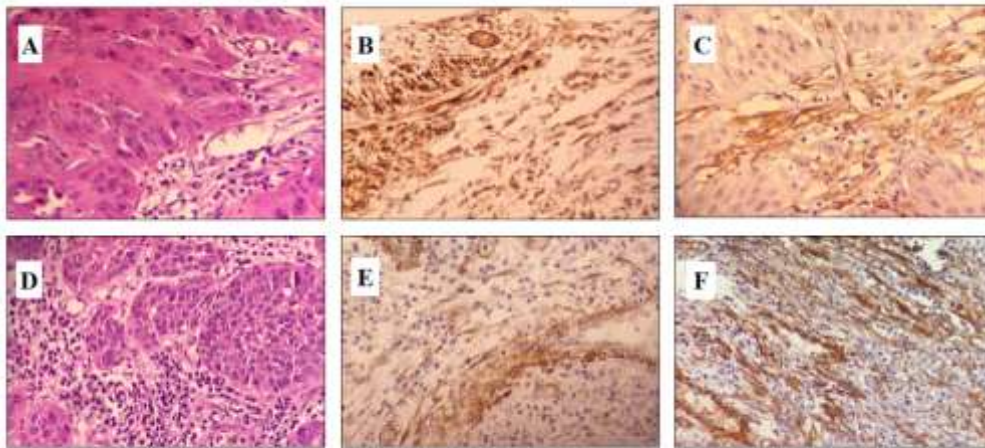


Figure 2

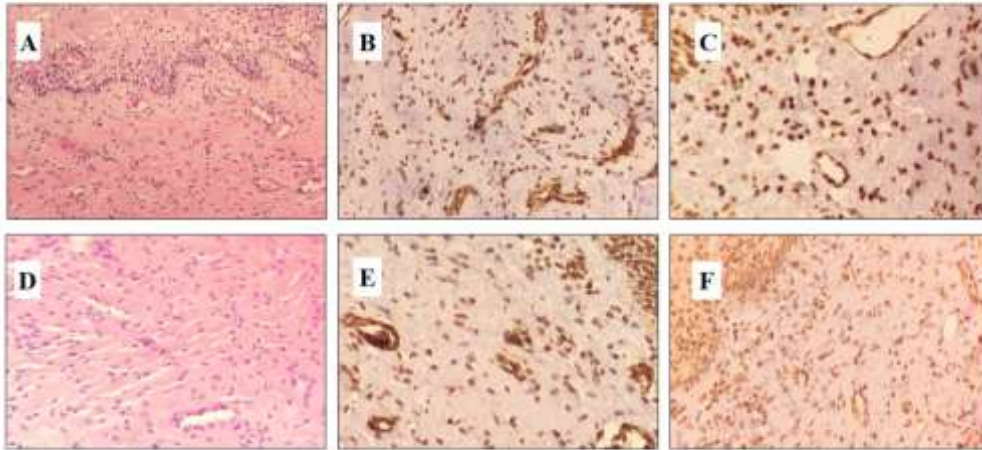


Figure 3

