

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA CAROLINNE DA SILVA**

**RELAÇÃO DO ESTROMA TUMORAL COM SOBREVIDA  
GLOBAL E LIVRE DE DOENÇA EM NEOPLASIAS  
MALIGNAS DE OVÁRIO**

**UBERABA – MG**

**2021**

ANA CAROLINNE DA SILVA

**RELAÇÃO DO ESTROMA TUMORAL COM SOBREVIDA  
GLOBAL E LIVRE DE DOENÇA EM NEOPLASIAS  
MALIGNAS DE OVÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

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

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

**UBERABA – MG**

**2021**

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

S578r Silva, Ana Carolinne da  
Relação do estroma tumoral com sobrevida livre de doença e sobrevida global em neoplasias malignas de ovário / Ana Carolinne da Silva. -- 2021. 68 f. : il., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021

Orientadora: Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

1. Neoplasias ovarianas. 2. Actinas. 3. Prolil endopeptidase. 4. Micro-ambiente tumoral. 5. Análise de sobrevida. I. Nomelini, Rosekeila Simões. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.11-006

Amanda Franzão R. Silva  
CRB-6/3461

ANA CAROLINNE DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO ESTROMA TUMORAL COM SOBREVIDA LIVRE DE  
PROGRESSÃO E SOBREVIDA GLOBAL EM NEOPLASIAS MALIGNAS DE  
OVÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina Translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

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

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.º Dr.º. Guilherme Vannucchi Portari

Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM

---

Prof.º Dr.º. Hélio Humberto Angotti Carrara

Universidade de São Paulo/USP

---

Prof.ª Dr.ª. Lucinda Calheiros Guimarães

Universidade Federal Do Triângulo Mineiro/UFTM

---

Prof.ª Dr.ª. Marisa De Carvalho Borges

Universidade Federal Do Triângulo Mineiro/UFTM

---

***DEDICO...***

**A Deus** por todas as bênçãos derramadas e recebidas.

**A meus avós, Neuza e Antônio,**

por toda criação e incentivo para que eu sempre caminhasse no caminho do bem com dignidade e responsabilidade, e por todo apoio para com a realização dos meus objetivos.

**A minha mãe Rosimeire,** pelo carinho imensurável e pelos sacrifícios para que eu tivesse uma boa educação.

**A minha tia Lígia,**

que sempre fora uma segunda mãe e sempre me apoiou em todas as minhas escolhas.

## ***AGRADECIMENTOS***

“A grandeza de uma profissão é talvez, antes de tudo, unir os homens: não há senão um verdadeiro luxo e esse é o das relações humanas.”

Antoine de Saint-Exupéry

**À minha orientadora, Dra. Rosekeila**, pelos incontáveis ensinamentos, pelos votos de confiança e por ter acreditado desde o princípio na minha capacidade de evolução para com as atribuições da pesquisa.

**Ao meu coorientador Dr. Eddie Fernando Cândido Murta**, pelo apoio na pesquisa

**À pós-doutora Millena Prata Jammal**, pela coordenação, apoio e sobretudo pelo carinho e amizade.

**Às funcionárias da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia**, pela prestatividade e colaboração.

**Aos médicos e residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**, por toda contribuição e apoio nas cirurgias durante os eventos de coleta de materiais no bloco cirúrgico.

**Aos funcionários e responsáveis do bloco cirúrgico**, por toda compreensão e auxílio necessário nos eventos de coletas de matérias.

**Aos funcionários e responsáveis do Serviço de Patologia Cirúrgica**, por terem cedido o espaço e equipamentos para a realização das técnicas de imunohistoquímica.

**Aos órgãos AREMG** (Associação de Apoio à Residência Médica – Minas Gerais), **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), **FUNEP** (Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba), **FAPEMIG** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), e **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil), pelo suporte para o desenvolvimento e consolidação da pesquisa.

**À PROPPG (Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação)** pelo auxílio financeiro durante a pesquisa. **À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**, onde realizou-se todo o projeto de pesquisa.

*"Se eu fui capaz de ver mais longe é porque estava de pé nos ombros de gigantes."*

*(Isaac Newton)*

## RESUMO

**OBJETIVO:** Os objetivos do estudo foram comparar a imunomarcção estromal de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e proteína de ativação de fibroblastos- $\alpha$  (FAP) entre tumores ovarianos *borderline* e neoplasias malignas de ovário, como também avaliar sua associação na sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) em pacientes com câncer de ovário.

**MÉTODOS:** Foram avaliadas no estudo pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna de ovário (n = 28) e tumor *borderline* de ovário (n = 18). Foi realizado estudo imunohistoquímico de  $\alpha$ -SMA e FAP no compartimento estromal. A comparação da imunomarcção entre tumores ovarianos *borderline* e malignos foi realizada pelo teste exato de Fisher. A sobrevida foi avaliada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de log-rank. A análise multivariada foi realizada por regressão de Cox. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS:** Avaliando a expressão estromal de FAP, a imunomarcção (2 e 3), que é uma marcação mais intensa, foi evidenciada mais em pacientes com neoplasia maligna de ovário do que em tumores *borderline* de ovário ( $p = 0,0331$ ). Não houve significância estatística na avaliação de  $\alpha$ -SMA. Avaliando apenas pacientes com câncer epitelial de ovário, houve uma maior SG em pacientes com imunomarcção estromal 3 de  $\alpha$ -SMA ( $p = 0,017$ ). Não houve significância estatística ao avaliar SG e SLD em pacientes com imunomarcção estromal de FAP, nem ao avaliar SLD em pacientes com imunomarcção estromal 3 de  $\alpha$ -SMA. Após a análise multivariada, os pacientes com imunomarcção estromal 3 de  $\alpha$ -SMA tiveram maior SG em comparação com imunomarcção 0, 1 ou 2 [OR (95% CI) = 0,107 (0,018-0,649),  $p = 0,015$ ].

**CONCLUSÃO:** A imunomarcção de FAP foi mais forte em neoplasia maligna de ovário comparada com a imunomarcção de pacientes com tumores ovarianos *borderline*. No câncer epitelial de ovário, houve uma maior SG em pacientes com imunomarcção estromal 3 de  $\alpha$ -SMA.

**PALAVRAS-CHAVE:** neoplasia maligna de ovário; tumores ovarianos *borderline*; alfa-actina de músculo liso; proteína- $\alpha$  de ativação de fibroblastos; microambiente tumoral; sobrevida global.

## ABSTRACT

**Objective:** The aims of the study were to compare the stromal immunostaining of smooth muscle alpha-actin ( $\alpha$ -SMA) and fibroblast activation protein- $\alpha$  (FAP) between borderline ovarian tumors and epithelial ovarian cancer, and to evaluate their association in overall survival (OS) and disease-free survival (SLD) in patients with ovarian cancer.

**Methods:** Patients diagnosed with malignant (n=28) and borderline ovarian tumors (n=18) were evaluated. Immunohistochemical study of stromal  $\alpha$ -SMA and FAP was carried out. The comparison of immunostaining between borderline and malignant ovarian tumors was performed using Fisher's exact test. Survival was assessed by the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Multivariate analysis was performed by Cox regression. The differences were considered significant for  $p < 0.05$ .

**Results:** Evaluating stromal FAP, stronger immunostaining (2 and 3) was more found in epithelial ovarian cancer than in borderline ovarian tumors ( $p = 0.0331$ ). There was no statistical significance in the assessment of  $\alpha$ -SMA. Evaluating only patients with epithelial ovarian cancer, there was a higher OS in patients with stromal  $\alpha$ -SMA immunostaining 3 ( $p = 0.017$ ). There was no statistical significance when evaluating OS and SLD in patients with stromal FAP immunostaining, nor evaluating SLD in patients with  $\alpha$ -SMA stromal immunostaining 3. After multivariate analysis, patients with stromal  $\alpha$ -SMA immunostaining 3 had higher OS compared to immunostaining 0, 1 or 2 [OR (95% CI) = 0.107 (0.018-0.649),  $p = 0.015$ ].

**Conclusion:** Stronger FAP immunostaining was more found in epithelial ovarian cancer than in borderline ovarian tumors. In epithelial ovarian cancer, there was a higher OS in patients with stromal  $\alpha$ -SMA immunostaining 3.

**Keywords:** malignant ovarian; borderline ovarian tumors; smooth muscle alpha-actin; fibroblast activation protein- $\alpha$ ; tumor microenvironment; overall survival.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Cortes histológicos de neoplasias ovarianas malignas: coloração imunohistoquímica de anti- $\alpha$ -SMA policlonal (A, B, 100 $\times$ ); anti-FAP policlonal (C, D, 100 $\times$ ).....	38
<b>Figura 2.</b> Sobrevida global e imunocoloração estromal de $\alpha$ -SMA (regressão de Cox).....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos tumores ovarianos malignos. Adaptado de World Health Organization Classification of Tumours.....	15
<b>Tabela 2:</b> Estadiamento do câncer de ovário maligno segundo a FIGO. *Adaptado de The New FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer.....	35
<b>Tabela 3:</b> Imunomarcção de FAP em tumores ovarianos borderline e câncer epitelial de ovário.....	41
<b>Tabela 4:</b> Análise univariada (método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank) e análise multivariada (regressão de Cox) das variáveis idade, grau histológico, estadiamento, metástase de linfonodo e imunocoloração estromal $\alpha$ -SMA considerando câncer epitelial de ovário e sobrevida global	41
<b>Tabela 5:</b> Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.....	42
<b>Tabela 6:</b> Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Borderline de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
<b>BOT</b>	tumores ovarianos <i>borderline</i>
<b>BSA</b>	albumina do soro bovino
<b>BRAF</b>	isoforma B da proteína Raf
<b>BRCA-1 ou BRCA-2</b>	breast cancer type 1 and 2
<b>CCL5</b>	Ligante 5 de quimiocina CC
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CTGF</b>	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ECS</b>	células endoteliais
<b>EMT</b>	transição epitélio mesenquimal
<b>EOC</b>	cancer epitelial de ovário
<b>EGF</b>	fator de crescimento epidérmico
<b>FACs</b>	Fibroblastos Associados ao Câncer
<b>FAP</b>	proteína de ativação do fibroblastos
<b>FAK</b>	Focal adesão quinase
<b>FGF</b>	fator de crescimento de fibroblastos
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>FSCN1</b>	Proteína de empacotamento de actina fascina 1
<b>HC-UFTM</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
<b>HGF</b>	fator de crescimento de hepatócitos
<b>IFN</b>	Interferon Gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPON</b>	Instituto de Pesquisa em Oncologia
<b>KRAS</b>	oncogene homólogo viral de sarcoma de rato Kirsten
<b>LOX</b>	Lisil oxidase ativa
<b>M</b>	Macrófagos
<b>MEC</b>	matriz extra celular
<b>MMP-12</b>	metaloproteinase-12
<b>m-RNA</b>	ácido ribonucleico mensageiro

---

<b>N</b>	número de casos
<b>NFκB</b>	fator de transcrição nuclear kappa B
<b>P</b>	probabilidade
<b>PBS</b>	tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
<b>PDGF</b>	fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PGE2</b>	prostaglandina E2
<b>P53</b>	proteína 53
<b>RT-qPCR</b>	reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
<b>SG</b>	sobrevida global
<b>SDF1</b>	fator 1 derivado das células estromais
<b>SLG</b>	sobrevida livre de doença
<b>TAFs</b>	fibroblastos associados ao tumor
<b>TGF-β</b>	fator de transformação de crescimento beta
<b>TH1</b>	T helper 1
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>TNF- α</b>	fator alfa de necrose tumoral
<b>VEGF</b>	fator de crescimento endotelial vascular
<b>α-SMA</b>	alfa-actina de músculo liso
<b>γ</b>	gama
<b>B</b>	beta
<b>%</b>	percentual
<b>®</b>	marca registrada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Câncer de ovário.....	15
1.2 Estroma.....	18
1.2.1 Células componentes do estroma.....	19
1.3 Células da vasculatura.....	20
1.3.1 Pericitos.....	20
1.3.2 Células endoteliais.....	21
1.4 Fibroblastos associados ao câncer (CAFs).....	22
1.4.1 A actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).....	23
1.4.2 Proteína alfa de ativação dos fibroblastos(FAP).....	24
1.5 Citocinas no estroma ovariano e sua relação nas neoplasias ovarianas.....	25
1.6 Angiogênese, invasão e metástase .....	27
1.6.1 Transição epitélio-mesenquimal .....	29
1.6.2 Componentes da matriz extracelular no estroma .....	31
1.6.3 Matriz extracelular no câncer de ovário .....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 HIPÓTESE.....	34
4 OBJETIVOS.....	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
6 RESULTADOS.....	40

7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	61

# 1 INTRODUÇÃO

## 2 1.1 Câncer de ovário

3 O câncer epitelial de ovário é umas das malignidades ginecológicas responsável  
4 por milhares de óbitos em mulheres em todo mundo. Os fatores de risco que contribuem  
5 para o desenvolvimento da neoplasia ovariana são diversos, porém o mais facilmente  
6 identificável é o fator genético, relacionado a mutações nos genes BRCA-1 ou BRCA-2  
7 (BERKENBLIT & CANNISTRA, 2005).

8 No Brasil, há a estimativa de 6.650 casos novos de câncer de ovário em 2020  
9 (INCA, 2020). De acordo com dados da Globocan (2020), a incidência global estimada  
10 de câncer de ovário foi de 313.959 novos casos diagnosticados em 2020, dos quais  
11 207.252 mulheres morreram da doença.

12 A incidência do câncer ovariano varia de acordo com a região, principalmente  
13 quando se compara países de baixo e alto poder aquisitivo. Variações nos critérios  
14 diagnósticos e também em fatores reprodutivos podem influenciar a ocorrência do câncer  
15 ovariano e suas respectivas taxas relativas por subtipo histológico. A incidência do câncer  
16 de ovário em alguns países e regiões distintos, como Europa, Ásia e América do Norte,  
17 indicaram estabilidade. Porém, nas regiões Leste/Sul da Europa, evidenciaram um  
18 aumento considerável na incidência de câncer de ovário, enquanto no norte da Europa  
19 notou-se queda (COBURN et al., 2017).

20 Outra vertente analisada por Coburn et al. (2017) foi a análise das proporções  
21 relativas dos subtipos histológicos. As proporções foram similares entre os países  
22 mencionados acima, exceto para as nações asiáticas, onde os carcinomas endometrióides  
23 e de células claras apresentaram uma proporção maior, enquanto os carcinomas serosos  
24 representaram uma proporção menor. Tais fatores evidenciam a necessidade de se analisar  
25 a variação geográfica, para se detectar e quantificar a incidência do câncer ovariano,  
26 juntamente com as diferenças na distribuição do subtipo histológico (COBURN et al.,  
27 2017).

28 A origem e toda a patogênese do câncer de ovário merecem atenção. Inúmeros  
29 estudos sobre esse tema vêm sendo realizados por longos anos, porém ainda os  
30 mecanismos não foram totalmente elucidados de forma concreta e específica. Um dos  
31 principais obstáculos nesse processo deve-se à heterogeneidade da doença e do  
32 comportamento dos tumores, que manifestam diferentes características patológicas e

1 clínicas. Mediante essas diferenças, diversos estudos genéticos, moleculares e  
2 morfológicos contribuíram para que um modelo de identificação tumoral fosse elaborado.  
3 Ele consiste em um modelo dualista onde as neoplasias ovarianas foram divididas em  
4 duas categorias: tumores ovarianos do tipo I e tumores ovarianos do tipo II (SHIH &  
5 KURMAN, 2004).

6 De acordo com as diferenças moleculares e clínico-patológicas existentes entre os  
7 tumores tipo I e tipo II, destacam-se que os tumores tipo I são neoplasias de baixo grau  
8 que surgem de maneira indolente e gradual. Na maioria das vezes, são neoplasias císticas  
9 unilaterais e volumosas. Quando confinados ao ovário, eles têm um excelente prognóstico  
10 e são responsáveis por 10% dos óbitos por câncer ovariano. Os tumores ovarianos tipo I  
11 são classificados em: tumores mucinosos, tumores malignos de Brenner, tumores  
12 endometrióides e tumores de células claras. Suas alterações moleculares são distintas das  
13 alterações encontradas nos tumores ovarianos do tipo II, como mutações frequentes  
14 BRAF/KRAS e baixa proliferação celular (SHIH & KURMAN, 2004; KURMAN &  
15 SHIH, 2016).

16 Em contrapartida, as neoplasias ovarianas do tipo II são neoplasias de alto grau,  
17 com potencial agressivo, que se desenvolvem rapidamente e são menores em relação ao  
18 volume do que as neoplasias ovarianas do tipo I. Em conjunto com essas neoplasias,  
19 geralmente ocorre a presença de ascite, o que é pouco comum nas neoplasias do tipo I.  
20 Os tumores que compõem o conjunto dos tumores ovarianos do tipo II são:  
21 carcinossarcomas e neoplasias serosas de alto grau. Suas alterações moleculares indicam  
22 mutações frequentes na P53 e alta proliferação celular, podendo ser caracterizadas como  
23 neoplasias de caráter maligno (SHIH & KURMAN, 2004; KURMAN & SHIH, 2016).E  
24 esses tumores malignos de ovário podem ser descritos em três grupos: tumores epiteliais-  
25 estromais; tumores dos cordões sexuais-estromais; e tumores de células germinativas  
26 como mostra a tabela 1.

27 Em adição, vale ressaltar as características de um outro tipo de neoplasia ovariana  
28 que são os tumores *borderline* de ovário (BOT). Essa variante tumoral apresenta  
29 características intermediárias entre as categorias benignas e malignas ovarianas. São  
30 tumores incomuns mas não raros, e que também apresentam características morfológicas,  
31 moleculares e genéticas que diferem dos tumores ovarianos benignos e malignos  
32 (HAUPTMANN et al., 2017). Em relação ao potencial de malignidade e análise  
33 histológica, os BOT apresentam atipia nuclear de caráter intermediário, baixas atividades  
34 mitóticas sem invasão estromal (o que vai na contramão das manifestações histológicas

1 dos tumores malignos ovarianos), indicando um melhor prognóstico comparado com os  
 2 tumores ovarianos malignos. Ademais, as taxas de sobrevida analisadas em 5 e 10 anos  
 3 são de 95 e 85%, respectivamente. Outro ponto relevante, é que devido à esses tumores  
 4 manifestarem em pacientes mais novas e apresentarem um melhor prognóstico  
 5 comparado com os tumores ovarianos malignos, as pacientes são submetidas à  
 6 abordagens cirúrgicas menos radicais e mais conservadoras, a fim de se preservar a  
 7 fertilidade dessas mulheres (PARK et al., 2018).

**Tabela 1** - Classificação dos tumores ovarianos malignos. Adaptado de *World Health Organization Classification of Tumours*, 2003 (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003).

<b>Tumores ovarianos</b>		
<b>Tumores da superfície epitelial-estromal</b>	<b>Tumores dos cordões sexuais-estromais</b>	<b>Tumores das células germinativas</b>
Tumores Serosos	Tumor de células da Granulosa	Disgerminoma
Tumores Mucinosos	Tumor de células de Sertoli-Leydig	Coriocarcinoma
Tumores Endometrioides	Tumor de células Esteroidais	Carcinoma embrionário
Tumor de Células Claras		Teratoma Imaturo
Tumor de Células Transicionais		Tumor do seio endodérmico
Tumor indiferenciado		

Fonte: TAVASSOLI & DEVILEE, 2003.

8 Retomando ao câncer ovariano, os sintomas do câncer ovariano são inespecíficos,  
 9 e as mulheres em sua maioria, se queixam do aumento da circunferência abdominal,  
 10 alterações urinárias, edema generalizado e em alguns casos dor na região pélvica. A  
 11 identificação precoce desses sintomas pode proporcionar um direcionamento clínico

1 excepcional, contribuindo de forma direta para a sobrevida. Ou seja, em estadiamentos  
2 iniciais (I e II), que correspondem a doença limitada ao ovário e à pelve, a sobrevida em  
3 5 anos é estimada em 70% a 90%. Enquanto em estadiamentos avançados (III e IV), que  
4 acometem o abdome inferior ou superior, a sobrevida em relação ao câncer ovariano varia  
5 de 10% a 30%. Comumente, o prognóstico desfavorável caracterizado pelos  
6 estadiamentos avançados deve-se, em grande parte, ao diagnóstico tardio das neoplasias,  
7 como também ao aparecimento de metástases. Essas metástases são caracterizadas pelo  
8 desprendimento de agregados celulares ou células tumorais que formam nichos fora da  
9 cavidade peritoneal, o que leva a doença para um estágio avançado, caracterizando um  
10 diagnóstico tardio e afetando a sobrevida (LOUGHRAN et al., 2018; EO et al., 2018).  
11 Isso indica que, quanto mais precocemente o câncer ovariano for detectado, melhor o  
12 prognóstico e maior a sobrevida. (BERKENBLIT & CANNISTRA, 2005; EO et al., 2018;  
13 GOFF et al., 2004).

14 Em relação ao diagnóstico do câncer ovariano, o exame físico comumente indica,  
15 em alguns casos, a presença da massa pélvica. A ultrassonografia pélvica transvaginal é  
16 utilizada para se identificar a presença de uma massa ovariana suspeita, além dos  
17 marcadores tumorais. Vale ressaltar que as técnicas de ressonância magnética e  
18 tomografia computadorizada também são utilizadas (EO et al., 2018; NOSSOV et al.,  
19 2008; SÖLÉTORMOS et al., 2016; MANEGOLD-BRAUER et al., 2013; MEDEIROS  
20 et al., 2011; NAM et al., 2010). Porém, o diagnóstico definitivo das neoplasias ovarianas  
21 necessita de uma confirmação através da realização de exame anátomo-patológico.

## 22 **1.2 ESTROMA**

23 Tumores sólidos malignos não são apenas células neoplásicas autônomas, eles são  
24 formados por células malignas e estroma que se influenciam mutuamente. Os diferentes  
25 tipos de células no ambiente estromal podem ser recrutados por células malignas para  
26 promover o crescimento do tumor e facilitar a metástase (BREMNES et al., 2011).

27 De acordo com a composição do estroma tumoral, ele é composto por células  
28 tumorais não malignas, como: fibroblastos associados ao câncer, células mesenquimais,  
29 células imunes inatas e adaptativas, vasculatura com células endoteliais e pericitos,  
30 proteínas estruturais (colágeno e elastina), proteínas especializadas (fibrilina, fibronectina  
31 e elastina) e proteoglicanos componentes da matriz extracelular. Outro componente do

1 estroma tumoral são as células imunes, e os macrófagos associados a tumores (TAMs),  
2 correspondem a metade da massa tumoral (BREMNES et al., 2011; MANTOVANI et al.,  
3 2008; HUGHES, 2008; COLVIN, 2014).

4 A ativação do microambiente do estroma tem sido apontada como um fator  
5 importante na progressão do câncer. O estroma reativo ou permissivo indica similaridade  
6 com a biologia do processo de cicatrização de feridas em tecidos com características  
7 normais, onde as células do estroma apresentam significativa produção de fatores  
8 constituintes da matriz extracelular (BREMNES et al., 2011; RØNNOV-JESSEN et al.,  
9 1996).

10 Os diversos agrupamentos celulares distintos situados no estroma, através de um  
11 rearranjo matricial, criam posteriormente um microambiente específico tumoral promotor  
12 da carcinogênese, resultando em proliferação, invasão e sobrevivência das células  
13 cancerígenas. Esses eventos baseiam-se em atividades orquestradas por uma interação  
14 célula a célula (RYNER L et al., 2015; BREMNES et al., 2011; KALLURI & ZEISBERG,  
15 2006).

16 O processo de regulação estromal responsável pela progressão tumoral no câncer  
17 epitelial de ovário ainda não foi completamente elucidado (RYNER *et al.*, 2015). Porém,  
18 sabe-se que o microambiente tumoral tem sido cada vez mais ressaltado pelo seu papel  
19 relevante na patogênese do câncer epitelial ovariano (RYNER et al., 2015; SAAD et al.,  
20 2010; WANG et al., 2005)

## 21 1.2.1 CÉLULAS COMPONENTES DO ESTROMA

### 22 Macrófagos associados ao tumor (TAMs)

23 Os macrófagos são células fagocíticas diferenciadas da linhagem mononuclear.  
24 Compõem o sistema imunológico e após migrarem para os tecidos, sofrem diferenciação  
25 em resposta a estímulos locais. São células heterogêneas que podem estimular ou suprimir  
26 o sistema imunológico (COLVIN, 2014; POLLARD, 2009).

27 Macrófagos e as células tumorais interagem juntamente de uma forma bidirecional  
28 através da troca de mediadores solúveis, influenciados pelo comportamento fenotípico e  
29 celular (COLVIN, 2014). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) correspondem a  
30 uma população de extrema heterogeneidade, manifestando diferenciações e tipos distintos

1 esquematicamente caracterizados, sendo M1 os macrófagos classicamente ativados e M2  
2 os alternativamente ativados (SOLINAS et al., 2009).

3 Os TAMs criam um microambiente de imunossupressão, contribuindo para a  
4 promoção da angiogênese, crescimento tumoral, motilidade e invasão. Durante o processo  
5 de metástase, os macrófagos residentes no nicho pré-metastático promovem o  
6 extravasamento de células tumorais, propiciando um ambiente favorável para o  
7 crescimento e sobrevivência (NOY & POLLARD, 2014).

8 Macrófagos classicamente ativados M1 se diferenciam na presença das citocinas  
9 secretadas pelas células Th1 envolvidas na resposta contra patógenos, assim como estão  
10 correlacionados com a rejeição tumoral e apresentação gênica. As citocinas relacionadas  
11 com essas ações deste macrófago são as citocinas IL-12, IL-1, IL-6, fator de necrose  
12 tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-23 (SICA et al., 2002)

13 Por outro lado, macrófagos alternativamente ativados M2 propiciam um aumento  
14 da angiogênese, influenciando o microambiente tumoral a secretar as metaloproteínases  
15 de matrizes (MMPS) ou IL-1 $\beta$  e assim induz a vascularização do tumor, produzindo  
16 VEGF, PDGF e TGF- $\beta$  (DIRKX et al., 2006). Esses macrófagos também produzem  
17 fatores quimioprotetores, como a catepsina b, que induzem resistência a drogas  
18 antitumorais (BRUCHARD et al., 2012; ZHANG et al., 2014; SOLINAS et al., 2009).

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

26 Estudos retrospectivos que abrangem a caracterização dos TAMs em neoplasias  
27 ovarianas demonstram que eles possuem similaridade com macrófagos M2 polarizados e  
28 expressam marcadores M2, tais como CD163, CD204, CD206 (receptor de manose) e  
29 Interleucina 10. Apesar de uma quantidade significativa de evidências emergentes, as  
30 quais sugerem que TAMs manifestam um perfil de ativação único em tumores ovarianos,  
31 muitas dúvidas ainda não foram esclarecidas. Como por exemplo, quais tipos de células  
32 imunológicas estão relacionadas aos subtipos histopatológicos das neoplasias ovarianas  
33 ou estadiamento tumoral. Tais informações requerem investigações mais abrangentes  
34 (COLVIN, 2014).

1           Portanto, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) do tipo M1 são responsáveis  
2 por suprimir a progressão do câncer, enquanto os macrófagos associados ao tumor do tipo  
3 M2 promovem a progressão do câncer (ZHANG et al., 2014).

### 4           **1.3 CÉLULAS DA VASCULATURA**

#### 5           **1.3.1 Pericitos**

6  
7           Os pericitos são células murais dos microvasos, que entraram em evidência  
8 atualmente como mediadores e reguladores da morfogênese vascular e homeostase  
9 cardiovascular (ARMULIK et al., 2011). São caracterizados também como células de  
10 apoio periendothelias que se estendem e envolvem as células endoteliais. Possuem  
11 heterogeneidade de caráter fisiológico, bioquímico e morfológico. Através da junção com  
12 as células endoteliais, compõem as paredes dos microvasos. Possuem, também, diversas  
13 outras características que se destacam: atuam na proliferação, diferenciação e regulação  
14 endotelial, secretam e sintetizam diversos agonistas auto-reguladores que agem nos vasos  
15 sanguíneos, atuam como células progenitoras, liberam e sintetizam componentes  
16 estruturais da matriz extracelular e da membrana basal, e por meio de conexões da  
17 membrana trans-basal, os pericitos têm a capacidade também de influenciar o  
18 comportamento direto das células endoteliais e participam diretamente na regulação do  
19 diâmetro capilar (STAPOR et al., 2014; SHEPRO & MOREL, 1993; GERHARDT &  
20 BETSHOLTZ, 2003).

21           Sabemos que a participação dos pericitos é essencial para o processo de regulação  
22 da angiogênese e na funcionalidade direta vasoativa, entretanto toda a funcionalidade dos  
23 pericitos ainda não está completamente elucidada e faz necessário investigações detalhas  
24 acerca dos mesmos (GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003; STAPOR et al., 2014).

#### 25           **1.3.2 Células endoteliais**

26           Juntamente com os pericitos, as células endoteliais são um dos componentes da  
27 vasculatura tumoral e da vasculatura normal. São células que, na fase embrionária,  
28 surgem do mesoderma, e uma das suas funções mais importantes é o revestimento das  
29 paredes dos vasos sanguíneos recém-formados. Durante a tumorigênese, as células

1 endoteliais necessitam ser recrutadas para que ocorra uma neoformação para nutrir o  
2 tumor em desenvolvimento (SPAW et al., 2017).

3 As células endoteliais formam a camada interna dos vasos sanguíneos, nutrindo  
4 uma barreira entre a circulação e o tecido. São envolvidas por células perivasculares, com  
5 suporte principalmente dos pericitos, que de uma forma dinâmica participam da regulação  
6 do tônus da vasculatura e no suporte estrutural do tubo vascular (SEYNHAEVE et al.,  
7 2018). São beneficiadas por diversos estímulos do seu ambiente, que por uma sequência  
8 de eventos, levam a progressão e proliferação das mesmas durante o processo de  
9 neoformação vascular. Muitos são esses eventos promotores da proliferação das células  
10 endoteliais, e os mais comuns são: o aumento da resistência apoptótica, sinais  
11 angiogênicos, migração, diferenciação, reestruturação do citoesqueleto, formação de um  
12 novo tubo vascular e alterações no equilíbrio proteolítico (MUÑOZ-CHÁPULI et al.,  
13 2004).

14 No microambiente tumoral, a interação entre as células endoteliais e os pericitos  
15 ocasiona um suporte angiogênico para o tumor (KELLY-GOSS et al., 2014). O início da  
16 angiogênese é provocado pela desconexão da dinâmica entre eles, o que fará com que  
17 surja uma nova vasculatura mediada pela redução dos pericitos e migração das células  
18 endoteliais. Em seguida, uma nova parede vascular estável será formada, e toda a  
19 interação entre as células endoteliais e os pericitos acontecem devido a estímulos das  
20 proteases e estímulos angiogênicos (SPAW et al., 2017). Portanto, todas essas evidências  
21 indicam que as desestabilizações nas interações entre pericitos e células endoteliais  
22 contribuem para a metástase tumoral e angiogênese (RAZA et al., 2010).

#### 23 **1.4 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER**

24 Os fibroblastos são um grupo celular caracterizado como o principal grupo  
25 componente do tecido conjuntivo, e contribuem também de forma funcional e estrutural,  
26 participando diretamente na regeneração e manutenção do tecido conjuntivo (HANSEN  
27 et al., 2016; KALLURI & ZEISBERG, 2006).

28 Além de apresentarem associação com células cancerígenas em todos os estágios  
29 do desenvolvimento do carcinoma (HANSEN et al., 2016), as funções dos fibroblastos  
30 são inúmeras, destacando-se: a efetiva produção de quimiocinas que facilitam o  
31 recrutamento de pericitos e células endoteliais na promoção de eventos angiogênicos,

1 participação na produção e deposição dos tipos I, III e V de fibronectina e colágeno, como  
2 também na produção de colágeno tipo IV que compõem a matriz extracelular (HANSEN  
3 et al., 2016; TOMASEK et al., 2002; KALLURI & ZEISBERG, 2006; CHANG et al.,  
4 2002). Em adição, os fibroblastos participam na síntese de proteínas da membrana basal,  
5 as metaloproteinases, e são extremamente importantes na manutenção e reparo da matriz  
6 extracelular (CHANG et al., 2002; HANSEN et al., 2016).

7 Os fibroblastos associados ao câncer são grupos celulares com fenótipo reativo  
8 dos fibroblastos comuns que são induzidos pelas células cancerígenas. Possuem  
9 similaridade com sítios inflamatórios e com fibroblastos ativados (HANSEN et al., 2016;  
10 MAO et al., 2013, CIRRI & CHIARUGI, 2011).

11 Através da interação com diferentes tipos de tumores, além de expressar algumas  
12 citocinas como IL-6 e SDF-1, os fibroblastos associados ao câncer são responsáveis pela  
13 expressão da alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), proteína alfa de ativação do  
14 fibroblastos (FAP), e também alguns fatores de crescimento que estimulam a proliferação  
15 celular do tumor, tais como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento  
16 de hepatócitos (HGF), fator beta de crescimento de fibroblastos (FGF) (CIRRI &  
17 CHIARUGI, 2011; KALLURI & ZEISBERG, 2006).

18 Embora a origem dos fibroblastos associados ao câncer não esteja totalmente  
19 esclarecida, acredita-se que eles podem originar-se de uma vasta população celular  
20 heterogênea, como as células mesenquimais derivadas da medula óssea, células do  
21 endotélio, fibroblastos residentes e adipócitos (SPAW et al., 2017; SHIGA et al., 2015;  
22 AUGSTEN, 2014).

23 Como um todo, a dinâmica entre os fibroblastos associados ao câncer e as células  
24 tumorais estimulam as células cancerosas a produzirem fatores que sustentam e ativam  
25 os próprios fibroblastos associados ao câncer, caracterizando uma resposta ou feedback  
26 positivo, o que resultará na promoção de eventos angiogênicos, remodelação de matriz  
27 extracelular, proliferação celular, e progressão do tumor (HANSEN et al., 2016; CIRRI  
28 & CHIARUGI, 2011).

#### 29 **1.4.1 Alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)**

30 A actina é uma proteína estrutural com funcionalidade na contração muscular e  
31 motilidade celular, que é facilmente encontrada no citoesqueleto em células eucarióticas.

1 E devido a essa abundância, pelo menos seis isoformas da actina foram identificadas  
2 (WEYMOUTH et al., 2012; VANDEKERCKHOVE & WEBER, 1978).

3 Cada actina é expressa de forma específica devido a uma identidade relacionada  
4 a aminoácidos. Em relação às seis isoformas descobertas da actina, sabe-se que a  
5 diferenciação foi feita devido a diferenciação de seis genes, e acredita-se também que  
6 duas isoformas estão presentes em todos os tipos celulares, que são as actinas não  
7 musculares conhecidas como  $\gamma$ -actinas e actinas  $\beta$ -citoplasmáticas (WEYMOUTH et al.,  
8 2012; MCHUGH et al., 1991; MIWA et al., 1991), e as outras quatro isoformas de actina  
9 são comumente encontradas em alguns grupos celulares especializados e também em  
10 músculos peculiares em adultos, que são conhecidas como actinas cardíacas, entéricas,  
11 esqueléticas e vasculares (WEYMOUTH et al., 2012; MCHUGH et al., 1991; MIWA et  
12 al., 1991).

13 Em adição, uma das isoformas mais conhecidas da actina é denominada alfa  
14 actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que é uma isoforma peculiar de células musculares lisas  
15 da vasculatura (SUN et al., 2016, SKALLI et al., 1986). Apresenta funcionalidade  
16 significativa na fibrogênese e pode ser encontrada nos vasos sanguíneos, nos  
17 miofibroblastos e em células musculares lisas (ANGGOROWATI et al., 2017, CHERNG  
18 et al., 2008; SHINDE et al., 2016).

19 É caracterizada como o marcador mais utilizado na identificação dos  
20 miofibroblastos, entretanto diversos outros marcadores como miosina do músculo liso,  
21 desmina ou vimentina, podem ser utilizados concomitantemente com a alfa actina de  
22 músculo liso para diferenciar subgrupos de células da musculatura, fibroblastos ou  
23 miofibroblastos (FRANCO et al., 2010).

24 Em adição, também pode ser associada a outros marcadores em técnicas de  
25 imunomarcção de neoplasias ovarianas, visto que somente a expressão de  $\alpha$ -SMA em  
26 alguns estudos não apresenta significância, necessitando associá-la com outros  
27 marcadores para a obtenção de resultados precisos (DA SILVA et al., 2018).

28 Uma razão que impulsiona o interesse investigativo para se entender e  
29 classificar a expressão de marcadores de superfície dos fibroblastos associados ao câncer,  
30 é em virtude de que os padrões e níveis relativos de sua expressão, podem ser fatores  
31 prognósticos e apresentarem relação com a sobrevida global (SHIGA, 2015).

#### 1.4.2 Proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP alfa)

A proteína alfa de ativação dos fibroblastos, além de ser um antígeno celular de superfície, é classificada também como marcador de fibroblastos associados ao câncer. É conhecida como uma proteína de transmembrana do tipo II, caracterizada como uma serina protease da família prolil oligopeptidase (POLGÁR, 2002; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015; KELLY et al., 2012).

É expressa de forma restrita e exclusiva em fibroblastos estromais, através de estímulos patológicos, onde é possível evidenciar sua expressão em situações como processos de granulação e cicatrização de feridas, fibrose, artrite, inflamação, quelóides, sarcomas ósseos, carcinomas epiteliais e em células-tronco do mesênquima derivadas da medula óssea (SCANLAN et al., 1994; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015; BAE et al., 2008; KELLY et al., 2012).

Estima-se que a expressão da FAP no compartimento estromal acomete mais de 90% das neoplasias de origem epitelial, e essa expressão elevada tem sido relacionada a um prognóstico ruim em diversos tipos de carcinomas (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015; COHEN et al., 2008; SHI et al., 2012; HENRY et al., 2007; ZHANG et al., 2011).

Comumente, não é expressa em tecido normal, entretanto sua presença em diversas neoplasias e processos patológicos indica um papel importante na facilitação de mecanismos de crescimento celular e invasão (KELLY et al., 2012; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015).

A FAP está relacionada também com o crescimento de densidade de microvasos, tendo papel na angiogênese (SPAETH et al., 2009). Além disso, de acordo com estudos retrospectivos, sua expressão pode ser considerada um preditor de sobrevida global e resistência a derivados da platina, sugerindo a utilização da FAP na clínica, na identificação de pacientes com risco de resistência à platina (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2015).

Outros estudos também evidenciaram que, através da realização de técnicas imunohistoquímicas, a FAP indicou positividade em imunomarcações em casos de câncer de ovário relacionados a estadiamentos avançados (grau histológico 2 e 3), comparadas com neoplasias benignas ovarianas, indicando assim, um marcador estromal de pior prognóstico (DA SILVA et al., 2018).

Outros estudos utilizando amostras isoladas de câncer de ovário em ratos, indicaram que o silenciamento do FAP inibiu o crescimento de tumores associados a

1 fibroblastos (TAFs), juntamente com a inibição do crescimento celular in vitro, e a  
2 expressão gênica de células-tronco. De forma específica a FAP desempenha um papel  
3 importante nos processos de angiogênese, tumorigênese e estromogênese do câncer de  
4 ovariano (LAI et al., 2012). E mesmo a FAP mostrando ser um marcador terapêutico  
5 estratégico para pacientes com neoplasias ovarianas, a FAP ainda necessita de  
6 investigações mais aprofundadas e uma elucidação mais concreta (LAI et al., 2012;  
7 KELLY et al., 2012).

## 8 **1.5 CITOCINAS NO ESTROMA OVARIANO E SUA RELAÇÃO NAS** 9 **NEOPLASIAS OVARIANAS**

10 A hipótese de que o ambiente inflamatório crônico ampara todo o processo  
11 fisiopatológico do surgimento dos tumores foi proposta por Virchow desde 1863  
12 (BALKWILL et al., 2001). Hoje, sabe-se que a proliferação celular sustentada em um  
13 ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes  
14 de dano ao DNA podem aumentar o risco de desenvolver uma neoplasia (MUNN, 2017).  
15 A resposta inflamatória crônica está cada vez mais aceita em sua relação com a  
16 fisiopatologia do surgimento e desenvolvimento dos tumores, embora os mecanismos  
17 moleculares e celulares dessa relação não estejam totalmente esclarecidos (COUSSENS  
18 & WERB., 2002).

19 Como já foi dito, os macrófagos são uns dos principais componentes do estroma  
20 tumoral. Essas células do sistema imune podem se comportar de maneiras diferentes de  
21 acordo com os estímulos do microambiente em que se encontram. Por exemplo, as  
22 neoplasias estimuladas por citocinas como IL-10 e IL-6 apresentam um fenótipo  
23 imunossupressor (POLLARD, 2004). E já foi observado que essas interleucinas  
24 encontram-se em níveis elevados em líquido ascítico de pacientes com câncer de ovário  
25 (MATTE et al., 2012).

26 Jammal et al. (2016) evidenciaram, através da análise imunohistoquímica  
27 qualitativa de imunomarcadores no estroma de ovários de pacientes com neoplasias de  
28 ovário, a relação entre citocinas e o prognóstico da doença. Concluíram que pacientes  
29 com neoplasias de ovário que tiveram maior expressão de TNF e IL-2 no estroma  
30 ovariano apresentaram pior prognóstico (JAMMAL et al., 2016).

1           Através de um estudo *in vitro*, foi observado que o TNF- $\alpha$  é super expresso por  
2 células neoplásicas do ovário. Essa superexpressão do TNF $\alpha$  estimula o TGF- $\alpha$  derivado  
3 de fibroblastos, o qual promove a colonização por metástase de células de câncer de  
4 ovário no peritônio, sendo este o local mais comum de disseminação do câncer ovariano  
5 (LAU et al., 2017).

6           A interleucina 18 (IL18) é uma citocina pró inflamatória secretada principalmente  
7 por macrófagos. No entanto, a presença de mRNA de IL18 em culturas primárias de tecido  
8 ovariano sugere que a IL18 pode ser secretada por outras células que não sejam do sistema  
9 imunológico. Ao avaliar a expressão de IL-18, proteína de ligação IL-18 e receptores de  
10 IL18 em tecido ovariano normal e de origem neoplásica, observou-se que os níveis de  
11 IL18 estavam aumentados no câncer epitelial de ovário em relação ao tecido ovariano  
12 normal. Além disso, a relação entre os níveis de IL18 e a proteína de ligação IL18, que é  
13 inversamente proporcional a forma ativa da IL18, estava menor no tecido tumoral. Os  
14 níveis de receptores IL18 não se mostraram diferentes nos tecidos ovariano e normal  
15 (MEDINA et al., 2014).

16           Portanto, a resposta imune aos tumores tem múltiplos e paradoxais papéis  
17 (SCHREIBER , 2011). É um importante mecanismo de defesa contra o crescimento do  
18 câncer, entretanto, a transformação maligna geralmente ocorre em tecido cronicamente  
19 inflamado que pode favorecer o crescimento do câncer (BALKWILL, 2001), onde as  
20 células tumorais podem escapar das defesas imunitárias criando um sítio privilegiado pelo  
21 sistema imunológico (JOYCE, 2015).

## 22   **1.6 ANGIOGÊNESE, INVASÃO E METÁSTASE**

23           Os vasos sanguíneos são fundamentais para a composição de células endoteliais  
24 que se juntam para a formação de novos vasos para manter a perfusão de tecidos e a  
25 harmonia do fluxo sanguíneo (HANAHAN & FOLKMAN, 1996; RISAU, 1995; RISAU  
26 & FLAMME, 1995).

27           A formação desses novos vasos sanguíneos no adulto é denominada de  
28 angiogênese, que é importante no desenvolvimento do carcinoma e essencial para o  
29 desenvolvimento e crescimento tumoral. Além disso, possui um papel em processos de  
30 metástases, visto que, é cada vez mais evidente que um processo desregulado de  
31 crescimento de um tumor só pode ser entendido quando as contribuições das células

1 normais presentes em um microambiente tumoral, como células endoteliais e fibroblastos,  
2 entre outros agrupamentos celulares, conduzem funções importantes em eventos de  
3 proliferação de células tumorais. Esses eventos ocorrem por sinais endócrinos, parácrinos  
4 e também por vias de sinalização célula-a-célula, de forma que todos esses agrupamentos  
5 celulares são orquestrados dentro do tecido, caracterizando uma interação heterotípica  
6 (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

7 O processo de angiogênese é complexo. A membrana basal que recobre o ducto  
8 do endotélio sofre degradação e as células endoteliais alteram sua forma e invadem o  
9 estroma. A partir daí o agrupamento de células endoteliais sofrem proliferação até que  
10 atinjam um nível específico e deixem de proliferar, unindo-se para a formação de um  
11 novo lúmen capilar. Todo esse processo é controlado por episódios de crescimento  
12 tumoral e processos patológicos, especialmente em cicatrização de feridas (HANAHAN  
13 & FOLKMAN, 1996).

14 Os promotores de angiogênese são conhecidos e podem ser: fator de  
15 crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) 1 ou  
16 2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico  
17 (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e as angiopoietinas (HANSEN et al.,  
18 2016; LI et al., 2010).

19 O VEGF é induzido por diversos tipos de tumores, e é específico para células  
20 endoteliais. Pode ser expresso em tumores e liberado por diversas células também  
21 situadas no tumor (HANSEN et al., 2016; KIM et al., 1996; FERRARA, 2005). A família  
22 do FGF (fator de crescimento de fibroblastos) corresponde a um grupo de polipeptídeos  
23 que se ligam à heparina com atividade mitogênica que está envolvida na angiogênese.  
24 Especialmente o FGF2 é essencial nos processos de fibrose tecidual e no crescimento dos  
25 fibroblastos e causa sobretudo efeito sobre as células endoteliais de forma autócrina ou  
26 parácrina, resultando na secreção de células estromais e tumorais (BREMNES et al.,  
27 2011; GUALANDRIS et al., 1996; DONNEM et al., 2009).

28 O PDGF são reguladores de pericitos (células presentes na parede vascular) e  
29 fibroblastos, e são importantes na progressão tumoral (BREMNES et al., 2011; OSTMAN  
30 & HELDIN, 2007; ANDRAE et al., 2008).

31 O EGF, através da ligação com seu receptor EGFR, leva a eventos de  
32 diferenciação, proliferação, e sobrevivência celular (BREMNES et al., 2011).

1 O HGF é secretado pelas células mesenquimais e atua principalmente em  
2 células endoteliais ou epiteliais, e é responsável também pela motilidade celular e  
3 crescimento celular parácrino (BREMNES et al., 2011).

4 E por fim, as angiopoietinas são mediadores fundamentais no processo de  
5 angiogênese, possuem propriedades de regulação da maturação dos vasos sanguíneos e  
6 propriedades anti-inflamatórias. Promovem cascatas de sinalização que desencadeiam  
7 eventos essenciais de angiogênese. São responsáveis pelo recrutamento de células  
8 musculares lisas vasculares e pericitos, bem como remodelamento e estabilização  
9 vascular (LINARES et al., 2014).

10 Vale ressaltar que os processos angiogênicos para o crescimento de tumores é  
11 de extrema relevância, e indicam que o crescimento tumoral e a metástase exigem uma  
12 vasculatura persistente. Sem um suporte vascularizado mediado por essa  
13 neovascularização, as células sofrem apoptose ou necrose (HANSEN et al., 2016;  
14 FOLKMAN, 1972; FOLKMAN, 1971; HOLMGREN et al., 1995).

15 Como a angiogênese desempenha um papel fundamental na fisiologia ovariana  
16 normal e na patogênese do câncer de ovário (MONK, 2016), terapias anti-angiogênicas,  
17 como o Bevacizumabe, proporcionam controle contínuo do tumor.

18 O Bevacizumabe (Avastin®), é um anticorpo monoclonal humanizado contra o  
19 fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Possui efeitos antitumorais através da  
20 inibição da angiogênese e é amplamente utilizado no tratamento de neoplasias malignas,  
21 como colo-retal, pulmão, rim e ovário (ROVIELLO et al., 2017).

22 Bevacizumabe mostrou-se ativo em estudos voltados para o câncer epitelial  
23 ovariano (EOC), proporcionando melhorias significativas em estudos pré-clínicos, série  
24 de casos, e ensaios clínicos (MABUCHI, 2008). Recentemente, quatro ensaios clínicos  
25 randomizados foram realizados adicionando o Bevacizumabe à quimioterapia de primeira  
26 linha (BURGER, 2011) ou à quimioterapia em “resistentes a derivados de platina”  
27 (PUJADE-LAURINE, 2014) ou “sensíveis a derivados de platina” (AGHAJANIAN,  
28 2012) em câncer de ovário recorrente. A combinação de Bevacizumabe com um regime  
29 baseado em paclitaxel e carboplatina oferece uma nova opção de tratamento para  
30 pacientes com EOC, especialmente naqueles com alto risco de progressão (RUAN, 2018).

### 1           **1.6.1 Transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês: *Epithelial-*** 2           ***Mesenchymal Transition*)**

3           Fazem parte do processo de metástase do câncer a invasão de células tumorais  
4           no tecido circundante, para dentro dos vasos sanguíneos ou linfáticos e extravasamento  
5           para um novo ambiente hospedeiro (CHAFFER, 2011). A transição epitelial-  
6           mesenquimal (EMT) é um processo pelo qual as células epiteliais adquirem um fenótipo  
7           mesenquimal migratório, caracterizado pela perda de marcadores epiteliais, aquisição de  
8           moléculas mesenquimais e aumento da mobilidade celular (SHANG, 2013), e  
9           desempenha um papel importante no processo de metástase do câncer (THIERY, 2002).

10          Evidências mostram que EMT ocorre através de numerosas alterações celulares  
11          e moleculares, incluindo um ganho de expressão de Vimentina e Fibronectina, e perda de  
12          E-caderina e queratina na membrana celular (KALLURI, 2009). Esta perda de E-caderina  
13          é considerada um evento fundamental no processo de EMT (TAN, 2016). Além disso, a  
14          EMT permite que as células transitórias tenham maior mobilidade celular, invasão  
15          tumoral e disseminação metastática e sejam mais resistentes às drogas citotóxicas  
16          (YILMAZ, 2011). Fatores de crescimento secretados, principalmente o fator de  
17          crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), podem levar à  
18          ativação da EMT das células cancerosas (XU, 2018).

19          O desenvolvimento de tumores requer a interação de fibroblastos e  
20          componentes associados da matriz extracelular (MEC). Quando o processo neoplásico se  
21          inicia, os fibroblastos são recrutados para o local por células cancerosas e ativados no  
22          ambiente local via TGF- $\beta$ , PDGF, HGF e outras moléculas de sinalização. À medida que  
23          as células transformadas se multiplicam, os fibroblastos são ativados e incorporados ao  
24          tumor. Esses fibroblastos associados ao câncer (CAFs) produzem proteínas e proteases  
25          desreguladas da MEC, formando um arcabouço para que as células cancerosas se  
26          prolifere. CAFs secretam TGF- $\beta$ , que fornece tanto um mecanismo de feedback  
27          positivo que incentiva a ativação de fibroblastos, como também orienta a transição  
28          epitélio-mesenquimal. Os CAFs também secretam fatores de sinalização parácrinos,  
29          incluindo IL-6, IL-8, NF $\kappa$ B, IFN- $\gamma$ , HGF, CTGF, CCL5 e PGE2, bem como moléculas da  
30          matriz extracelular, como colágenos, MMPs, tenascina C e periostina (LU, 2012).

31          Células cancerosas, sob influência da sinalização pelos CAFs, podem sofrer  
32          transição epitélio-mesenquimal com baixa expressão de E-caderina e regulação positiva  
33          de  $\beta$ -catenina e Twist, e escapar através da membrana basal com acesso à vasculatura para

1 disseminação metastática. Células cancerosas também podem se acumular nos gânglios  
2 linfáticos e metastatizar através dos linfáticos. O enrijecimento e a linearização do  
3 colágeno pela lisil oxidase (LOX) caracterizam essa MEC disfuncional, que é mais firme  
4 do que os tecidos circundantes, semelhante a uma cicatriz. A MEC anormal é pró-  
5 tumorigênica e pró- angiogênica. A membrana basal da nova vasculatura tumoral é mais  
6 porosa e permeável do que o normal, o que pode permitir metástases hematogênicas em  
7 locais distantes e infiltração imune. As células inflamatórias são recrutadas para o estroma  
8 do tumor e liberam citocinas. A desmoplasia, uma reação fibrótica local associada a  
9 tumores sólidos, resulta em aumento do tecido conjuntivo. As células cancerosas podem  
10 ser depuradas por linfáticos locais, que drenam para os linfonodos, iniciando metástases  
11 linfonodais em muitos tipos de tumores. As células epiteliais cancerígenas podem sofrer  
12 EMT e invadir através da membrana basal, permitindo a disseminação hematogênica (LU,  
13 2012).

14 A FSCN1 é uma proteína agregadora de actina que atua no movimento celular  
15 sob condições fisiológicas ou patológicas (HASHIMOTO, 2005). Sua superexpressão  
16 promoveu a migração e invasão de células cancerígenas (JAWHARI, 2003) e foi  
17 associada a fenótipos clinicamente desfavoráveis em carcinomas epiteliais humanos  
18 incluindo o de ovário (HASHIMOTO, 2005). Em estudos de Li et al (2018), a expressão  
19 de FSCN1 aumentou significativamente no EOC e, especialmente, no EOC com  
20 metástase. Eles demonstraram através de estudo em amostras de câncer epitelial de ovário  
21 (EOC) por RT-qPCR, que a expressão de FSCN1 foi significativamente correlacionada  
22 com estágios clínicos avançados no câncer epitelial de ovário, e que a FSCN1 interage  
23 fisiologicamente e aumenta o nível de lesmal para promover a EMT em células de câncer  
24 de ovário, indicando um mecanismo de EMT no câncer de ovário (LI et al., 2018).

### 25 **1.6.2 Componentes da matriz extracelular no estroma**

26 A matriz extracelular é composta por uma grande coleção de componentes  
27 bioquimicamente distintos, incluindo proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e  
28 polissacarídeos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas (OZBEK et al.,  
29 2010). Estruturalmente, esses componentes compõem a membrana basal, que é produzida  
30 conjuntamente por células epiteliais, endoteliais e estromais para separar o epitélio ou o  
31 endotélio do estroma, e a matriz intersticial, que é produzida principalmente pelas células  
32 estromais (EGEBLAD et al., 2010).

1 Quando reunidos de maneira ordenada, os componentes da MEC conferem às  
2 matrizes rigidez, porosidade, insolubilidade e disposição que determinam seu papel na  
3 integridade dos tecidos, além de funcionar como uma barreira. Tais propriedades físicas  
4 da MEC desempenham papéis tanto negativos quanto positivos na migração celular (LU,  
5 2012).

6 A fibrina, formada pela quebra do fibrinogênio plasmático e depositada na  
7 MEC, é encontrada no início da formação da matriz, juntamente com a fibronectina e a  
8 vitronectina (MIRON, 2017). Com relação ao crescimento tumoral, Dvorak sugeriu um  
9 papel tumorigênico da fibrina, propondo que ela pode auxiliar a tumorigênese, fornecendo  
10 um suporte para células malignas, protegendo as células tumorais do ataque imune e  
11 auxiliando na angiogênese. Evidências recentes mostram que a fibrina pode ter um papel  
12 ainda mais ativo na mediação da progressão maligna - células tumorais de pulmão  
13 embebidas em fibrina aumentam os níveis de fibronectina e ativam integrinas, levando à  
14 regulação positiva de *Slug*, um importante mediador de EMT e metástases (KNOWLES,  
15 2013). A rede de fibrina também promove a angiogênese tanto na progressão do tumor  
16 como na cicatrização de feridas.

17 A fibronectina também tem um papel proeminente no comportamento  
18 estromal. O alongamento da fibronectina leva à exposição diferencial dos sítios de  
19 ligação, o que fornece um amplo espectro de interações com as células e outras proteínas  
20 estromais (TRACY, 2016). E também está implicada na angiogênese tumoral (FOSTER,  
21 2018).

22 O colágeno é outra proteína da ECM que influencia significativamente a  
23 biologia do estroma e afeta os tumores pela modulação das propriedades mecânicas do  
24 leito tumoral. Estudos *in vivo* em humanos e camundongos mostram que o aumento da  
25 rigidez devido ao espessamento do colágeno e à conformação linear conduzem a invasão  
26 tumoral, mediada pela aglomeração de Lysyl oxidase (LOX), Focal adhesion kinase  
27 (FAK) e integrina (LEVENTAL, 2009).

28 As integrinas são receptores de adesão que ancoram as células à ECM  
29 (SCHNITTERT, 2018). Em tumores, elas são cruciais para a adesão e invasão de células  
30 cancerígenas. O agrupamento de integrinas é induzido pela rigidez do tumor e leva ao  
31 desenvolvimento de adesão focal. As integrinas são fundamentais para a montagem de  
32 redes de fibronectina pelo CAF para facilitar a invasão tumoral, especialmente a integrina  
33  $\alpha V\beta 3$  (ATTIEH, 2017).

1           Em relação aos glicanos intersticiais e proteínas glicosiladas, a fragmentação  
2 do hialuronano parece apoiar o crescimento do tumor ao aumentar o recrutamento de  
3 vasos sanguíneos. A decorina é um proteoglicano reconhecido por seu papel importante  
4 na regulação da sinalização de fibroblastos (MOHAN, 2010). A decorina é um inibidor  
5 de TGF- $\beta$  de alta afinidade (YAMAGUCHI, 1990) que modula substancialmente a  
6 biologia estromal e também demonstrou regular a fibrilogênese e contração do colágeno.  
7 Assim como o hialuronano, a decorina tem um papel binário na disseminação maligna  
8 (SANTRA, 1995).

9           Mudanças anormais na quantidade e composição da MEC podem alterar  
10 significativamente as propriedades bioquímicas da MEC, potencializar os efeitos  
11 oncogênicos das diversas vias de sinalização do fator de crescimento e desregular os  
12 comportamentos das células durante a transformação maligna (LU, 2012). Um aumento  
13 na deposição de colágeno ou rigidez da MEC, isoladamente ou em combinação, regula  
14 positivamente a sinalização da integrina e pode, assim, promover a sobrevivência e  
15 proliferação celular (PASZEK et al., 2005). A dinâmica anormal da MEC pode  
16 comprometer a membrana basal como uma barreira física e promover a transição  
17 epitelial-mesenquimal, que em conjunto pode facilitar a invasão tecidual por células  
18 cancerosas (RADISKY & RADISKY, 2010).

### 19           **1.6.3 Matriz extracelular no câncer de ovário**

20           Estudos indicam que a transição epitelial-mesenquimal desempenha um papel  
21 crucial na disseminação metastática do câncer epitelial de ovário (YING, 2016; LI, 2018).  
22 Assim como no câncer de mama, o EOC e seus implantes peritoneais são frequentemente  
23 fibróticos e circundados por estroma reativo desmoplásico (LENGYEL, 2010).

24           A progressão do câncer ovariano envolve o descolamento de células  
25 cancerígenas do carcinoma in situ na tuba uterina ou do tumor ovariano primário,  
26 disseminação para a cavidade peritoneal como células únicas ou esferóides, e fixação nas  
27 superfícies mesoteliais do omento, intestino e parede do abdome (KLYMENKO, 2017).

28           Acredita-se que a unidade metastática mínima do EOC seja um agregado  
29 multicelular que se esfolia do tumor primário e se move por toda a cavidade peritoneal  
30 pelo fluxo peritoneal de fluido normal (LENGYEL, 2010).

1 À medida que as metástases aumentam de tamanho, as células cancerígenas  
2 induzem mudanças pró-tumorigênicas nas células estromais do microambiente, incluindo  
3 um aumento no número de fibroblastos e uma membrana basal mais rígida (KENNY,  
4 2007).

5 Além do remodelamento direto da MEC, a inflamação associada ao implante de  
6 células EOC também altera a superfície peritoneal/ mesotelial e promove uma resposta  
7 estromal desmoplástica (FREEDMAN, 2004). Além disso, existe um consenso crescente  
8 de que a endometriose - e a inflamação e fibrose associadas nos tecidos extrauterinos,  
9 incluindo o peritônio e os ovários - aumenta o risco de EOC (NEZHAT, 2008).

10 Como um componente importante do nicho tumoral, a MEC passou a ser vista  
11 como um participante essencial em vários estágios do processo carcinogênico, onde sua  
12 dinâmica desregulada é capaz de romper a integridade dos tecidos e promover a  
13 transformação e invasão das células epiteliais, desviar o comportamento das células  
14 estromais levando à angiogênese e inflamação promotoras de tumor pelas células  
15 endoteliais e células imunes, respectivamente, tanto nos sítios primários quanto nos  
16 metastáticos (LU, 2012).

## 17 **2. JUSTIFICATIVA**

18 São necessárias novas estratégias para complementar a terapêutica do câncer de  
19 ovário, e a descoberta de novos fatores prognósticos é importante para guiar melhor o  
20 tratamento. Fatores relacionados ao estroma tumoral podem ter relação com o prognóstico  
21 em câncer de ovário, e a avaliação da sobrevida livre de doença e sobrevida global são  
22 essenciais para esse entendimento.

## 23 **3. HIPÓTESE**

24 Espera-se que a expressão imunohistoquímica da alfa actina de músculo liso  
25 ( $\alpha$ SMA) e da proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP), no compartimento  
26 estromal, seja maior em neoplasias malignas de ovário quando comparada com tumores  
27 *borderline* de ovário, e que haja relação de sua expressão com a sobrevida livre de doença  
28 e sobrevida global em pacientes com câncer de ovário.

#### 1 4. OBJETIVOS

2 1. Investigar a expressão imunohistoquímica de dois marcadores de  
3 fibroblastos associados a carcinoma (CAFs), a alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) e a  
4 proteína alfa de ativação dos fibroblastos (FAP), no compartimento estromal de  
5 neoplasias malignas e *borderline* de ovário.

6 2. Avaliar a associação de  $\alpha$ SMA e FAP com a sobrevida livre de doença e  
7 sobrevida global em neoplasias malignas de ovário.

#### 8 5. MATERIAIS E MÉTODOS

9 Foram avaliadas de forma prospectiva as pacientes atendidas no Ambulatório de  
10 Massa Pélvica da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia / Instituto de Pesquisa em  
11 Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, com  
12 indicação de tratamento cirúrgico de acordo com critérios pré-estabelecidos, seguindo o  
13 protocolo do serviço de cirurgia de massa pélvica da Universidade Federal do Triângulo  
14 Mineiro (MURTA et al., 2004; MURTA & NOMELINI, 2006).

15 Foram revisados os resultados anátomo-patológicos em parafina, sendo então  
16 incluídas no estudo as pacientes com diagnóstico confirmado de neoplasia maligna de  
17 ovário (n=28) e neoplasias *borderline* (n=18).

18 Foi realizado estudo imunohistoquímico de dois marcadores de fibroblastos  
19 associados a carcinoma (CAFs), a alfa atina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) e a proteína alfa de  
20 ativação dos fibroblastos (FAP), e leitura da mesma no compartimento estromal de  
21 neoplasias malignas e *borderline* epiteliais de ovário, conforme detalhado a seguir.

22 O estudo foi enviado ao CEP, número CAAE 34770014.4.0000.5154 (ANEXO  
23 A).

24 O Termo de Consentimento foi obtido de cada paciente incluída no estudo  
25 (ANEXO B).

26 Foram anotados em banco de dados específico para o estudo os seguintes dados  
27 dos prontuários: idade, paridade, *status* hormonal, tipo histológico, grau histológico,  
28 estadiamento (FIGO), metástases em linfonodos, sobrevida global e sobrevida livre de  
29 doença.

## 1 5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

2 Diagnóstico de neoplasia epitelial maligna de ovário e tumor *borderline* de ovário.

## 3 5.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

4 a) Torção do pedículo anexial, b) neoplasia maligna secundária de ovário  
5 (metástase), c) tratamento prévio e, d) recidiva.

## 6 5.3 ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

7 Foi realizado no Serviço de Patologia Cirúrgica do HC/UFTM através de cortes  
8 embebidos em parafina, sendo que os casos foram revisados por um observador do  
9 Serviço de Patologia Cirúrgica, para a escolha dos melhores cortes para a realização de  
10 estudo imunohistoquímico. A avaliação anátomo-patológica e o estadiamento dos casos  
11 foram realizados de acordo com os critérios da *International Federation of Gynaecology*  
12 *and Obstetrics* – FIGO (ZEPPERLICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014) (tabela 2).

13 Todos os estadiamentos foram revisados e escritos de acordo com o estadiamento  
14 de 2014. A relação dos estadiamentos das neoplasias ovarianas está descrita na tabela 2.

**Tabela 2** - Estadiamento do câncer de ovário maligno segundo a FIGO. \*Adaptado de *The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer* (ZEPPERINICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014).

---

Estadio I – Tumor limitado aos ovários ou *Tubas uterinas*.

Estadio IA: Tumor limitado a um ovário ou Trompa(s) de Falópio, não há células malignas na ascite ou lavado peritoneal. Sem tumor na superfície do ovário ou Trompa(s) de Falópio, com cápsula intacta

Estadio IB: Tumor limitado aos dois ovários ou Trompas de Falópio, não há células malignas na ascite ou lavado peritoneal. Sem tumor na superfície dos ovários ou Trompas de Falópio, com cápsula intacta

Estadio IC: Tumor limitado a um ou ambos os ovários ou Trompa(s) de Falópio, com alguma das alterações:

*IC1: Rompimento cirúrgico intra-operatório do tumor*

*IC2: Cápsula rota antes da cirurgia ou na superfície ovariana ou da Trompa(s) de Falópio*

*IC3: Células malignas na ascite ou lavado peritoneal*

---

Estadio II – Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou Trompas de Falópio com extensão pélvica (abaixo cavidade pélvica) ou *câncer peritoneal primário*<sup>b</sup>

Estadio IIA: Extensão e/ou metástase para útero e/ou Trompa(s) de Falópio e/ou Trompa(s) de Falópio e/ou ovários

Estadio IIB: Extensão para outros tecidos intra-peritoneais pélvicos.

---

Estádio III – Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou Trompas de Falópio, ou câncer peritoneal, confirmação histológica ou citológica de propagação para o peritônio fora da pelve e/ou metástase para os linfonodos retroperitoneais

Estadio IIIA1: Somente linfonodos retroperitoneais positivos (comprovado citologicamente ou histologicamente)

*IIIA1(i): Metástase de até 10 mm em sua maior dimensão*

*IIIA1(ii): Metástase maior que 10 mm em sua maior dimensão*

---

---

Estadio IIIA2: Envolvimento peritoneal microscópico extra-pélvico (acima da cavidade pélvica), com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos

Estadio IIIB: Metástase peritoneal macroscópica além da pelve até 2 cm em sua maior dimensão, *com ou sem metástase para os linfonodos retroperitoneais* (inclui extensão do tumor para cápsula do fígado e baço, sem envolvimento do parênquima de qualquer órgão)

Estadio IIIC: Metástase peritoneal macroscópica além da pelve acima de 2 cm em sua maior dimensão, com ou sem metástases para os linfonodos retro-peritoneais (inclui extensão do tumor para cápsula do fígado e baço, sem envolvimento do parênquima de qualquer um dos órgãos)

---

Estadio IV – Metástases à distância excluindo metástases peritonias

*Estadio IVA: O derrame pleural com citologia positiva*

*Estadio IVB: Metástases para o parênquima e metástases para órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal)<sup>c</sup>*

---

<sup>a</sup>Não é possível ter o câncer peritoneal no estágio I

<sup>b</sup>Aderências densas com células tumorais comprovadas histologicamente justificam a atualização de tumores do Estádio I para Estádio II.

<sup>c</sup>Metástases extra-abdominais incluem infiltração intestinal transmural e depósito umbilical.

\*O sistema de estadiamento do câncer de ovário é estabelecido pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) baseando-se no resultado obtido durante o ato cirúrgico. Fonte: ZEPPERLICK & MEINHOLD-HEERLEIN, 2014.

## 1 5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

2 Os espécimes obtidos por ressecção cirúrgica foram processados em parafina e  
3 revisados por patologista experiente. Os casos selecionados foram submetidos a novos  
4 cortes (4µm) em lâminas silanizadas (ATPS - Silano, Sigma® A3648), empregando-se o  
5 Sistema de detecção de Polímeros Novolink™.

6 As lâminas permaneceram em estufa a uma temperatura de 56°C por um período  
7 de 24h, e em seguida foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol, permanecendo 5  
8 minutos em cada banho e desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto e 1 banho de álcool  
9 a 80%, 10 segundos cada banho. Posteriormente, após as lâminas permaneceram em  
10 banho de solução salina tamponada, o PBS (pH 7.2) durante 5 minutos, para hidratação.

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

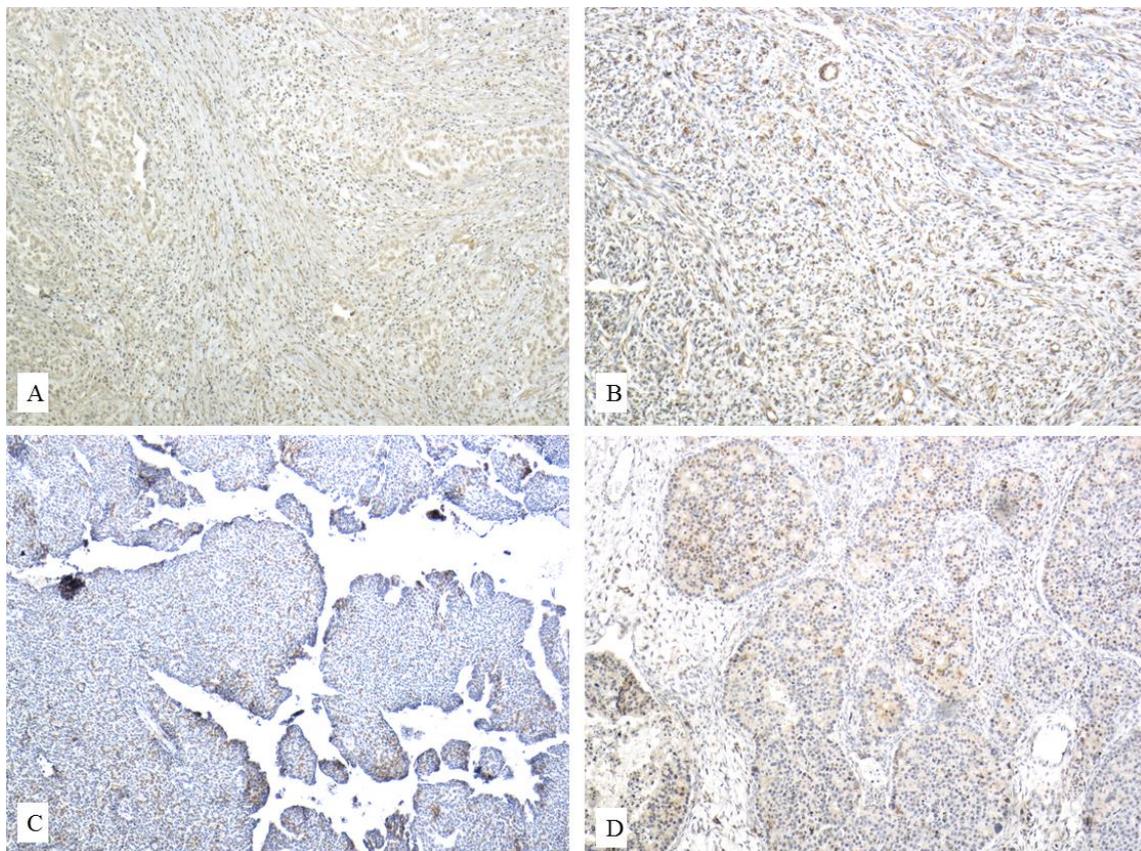
7 As lâminas foram colocadas em um rack e lavadas com água destilada e  
8 enxugadas, cuidadosamente, na adjacência do corte, não permitindo que os cortes  
9 ficassem secos. Após este processo, as lâminas foram colocadas em uma prancha de  
10 incubação e para neutralizar a peroxidase endógena foi utilizado o Bloqueador de  
11 Peroxidase (água oxigenada à 3%) sobre cada corte durante 15 minutos. Após esta etapa,  
12 as lâminas foram Lavadas 3 vezes em tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem. Em  
13 seguida as lâminas foram incubadas com Bloqueador de Proteínas por 15 minutos. Após  
14 esta etapa, as lâminas foram Lavadas 3 vezes em tampão PBS durante 5 minutos cada  
15 lavagem e incubadas com anticorpo primário diluído em BSA, (o anticorpo foi diluído  
16 em albumina do soro bovina (Sigma®) de acordo com as indicações presentes em suas  
17 especificações. Essas preparações de albumina bovina (BSA a 2%) e anticorpo primário  
18 permitem bloquear as ligações inespecíficas, para reduzir coloração de fundo), por cerca  
19 de 18 horas, em câmara úmida, a 4 °C. Foram utilizados controles positivos para cada  
20 anticorpo, mediante pré-requisitos do fabricante.

21 Após a incubação overnight a 4 °C com os anticorpos específicos anti- $\alpha$ SMA e  
22 anti-FAP, as lâminas foram colocadas à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e  
23 foram novamente lavadas com tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem e secas. Os  
24 anticorpos primários utilizados no trabalho, diluições e controles estão descritos no Anexo  
25 C. As lâminas então, foram incubadas com Anticorpo pós-primário durante 30 minutos.  
26 Foram lavadas com tampão PBS durante 5 minutos. Em seguida as lâminas foram  
27 incubadas com Polímero Novolink™ durante 30 minutos. Foram lavadas com tampão  
28 PBS durante 5 minutos cada lavagem. Após lavagem com PBS, as lâminas foram  
29 reveladas através da adição da solução cromógena (Diaminobenzidine - DAB), por 5  
30 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas em  
31 hematoxilina de Harris. Finalmente as lâminas foram imersas em 3 banhos de álcool  
32 absoluto 10 segundos cada, para retirada do excesso de água, 1 banho de xilol fenicado e  
33 3 banhos de xilol, por 5 minutos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas

1 com entellan para posterior análise. As soluções e tampões utilizados constam no Anexo  
2 D.

3 Foram utilizados controles positivo e negativo. Dois observadores avaliaram as  
4 lâminas. A intensidade de imunomarcção no estroma foi avaliada subjetivamente  
5 utilizando-se 0 a 3: 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada),  
6 3 (marcação forte).(Figura 1).

**Figura 1.** Cortes histológicos de neoplasias ovarianas malignas: coloração imunohistoquímica de anti- $\alpha$ -SMA policlonal (A, B, 100  $\times$ ); anti-FAP policlonal (C, D, 100  $\times$ ).



Fonte: A Autora

## 7 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

8 Os dados foram analisados através dos softwares GraphPad Instat e IBM SPSS  
9 Statistics 20. No estudo imunohistoquímico, a concordância entre os dois observadores  
10 foi realizada pelo método kappa:  $\kappa < 0,4$ : concordância fraca;  $0,4 \leq \kappa < 0,8$ : concordância  
11 moderada;  $0,8 \leq \kappa < 1,0$ : concordância forte;  $\kappa = 1,0$ : concordância perfeita. Todos os casos

1 discordantes foram reavaliados e o resultado definido por consenso. A comparação da  
 2 imunomarcção entre tumores ovarianos *borderline* e malignos foi realizada pelo teste  
 3 exato de Fisher. A sobrevida foi avaliada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de  
 4 log-rank. A análise multivariada foi realizada por regressão de Cox. As diferenças foram  
 5 consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

## 6 6. RESULTADOS

7 No estudo foram avaliadas 18 pacientes diagnosticadas com tumores ovarianos  
 8 *borderline* e 28 pacientes diagnosticadas com neoplasias malignas de ovário.

9 A tabela 3 demonstra a diferença na marcação tecidual estromal por  
 10 imunohistoquímica dos fibroblastos associados ao câncer entre neoplasias *borderline* e  
 11 malignas de ovário. Para a leitura da expressão imunohistoquímica foi excluída uma  
 12 paciente com neoplasia *borderline* de ovário da análise de FAP, pois os cortes não estavam  
 13 satisfatórios, permanecendo 17 pacientes respectivamente, mas a paciente fora utilizada  
 14 em outras análises. Avaliando a imunomarcção de FAP estromal, imunomarcções mais  
 15 fortes (2 e 3) foram mais encontradas no câncer epitelial de ovário epitelial do que em  
 16 tumores ovarianos *borderline* ( $p = 0,0331$ ). Não houve significância estatística na  
 17 avaliação de  $\alpha$ -SMA ( $p = 0,7395$ ).

**Tabela 3:** Imunomarcção de FAP em tumores ovarianos *borderline* e câncer epitelial de ovário.

	Imunomarcção 2/3	Imunomarcção 0/1	p
Tumores ovarianos <i>borderline</i> (n=17)	5 (29.4%)	12 (70.6%)	<b>0.0331</b>
Tumores ovarianos malignos (n=28)	18 (64.3%)	10 (35.7%)	

Teste exato de Fisher

1 Avaliando-se somente as pacientes com câncer epitelial de ovário, houve maior  
 2 SG em pacientes com imunomarcção 3 estromal de  $\alpha$ -SMA ( $p=0.017$ ). Não houve  
 3 significância estatística avaliando-se SG e SLD em pacientes com imunomarcção 3  
 4 estromal de FAP ( $p=0.139$  e  $p=0.751$ , respectivamente), nem avaliando-se SLD em  
 5 pacientes com imunomarcção 3 estromal de  $\alpha$ -SMA ( $p=0.283$ ).

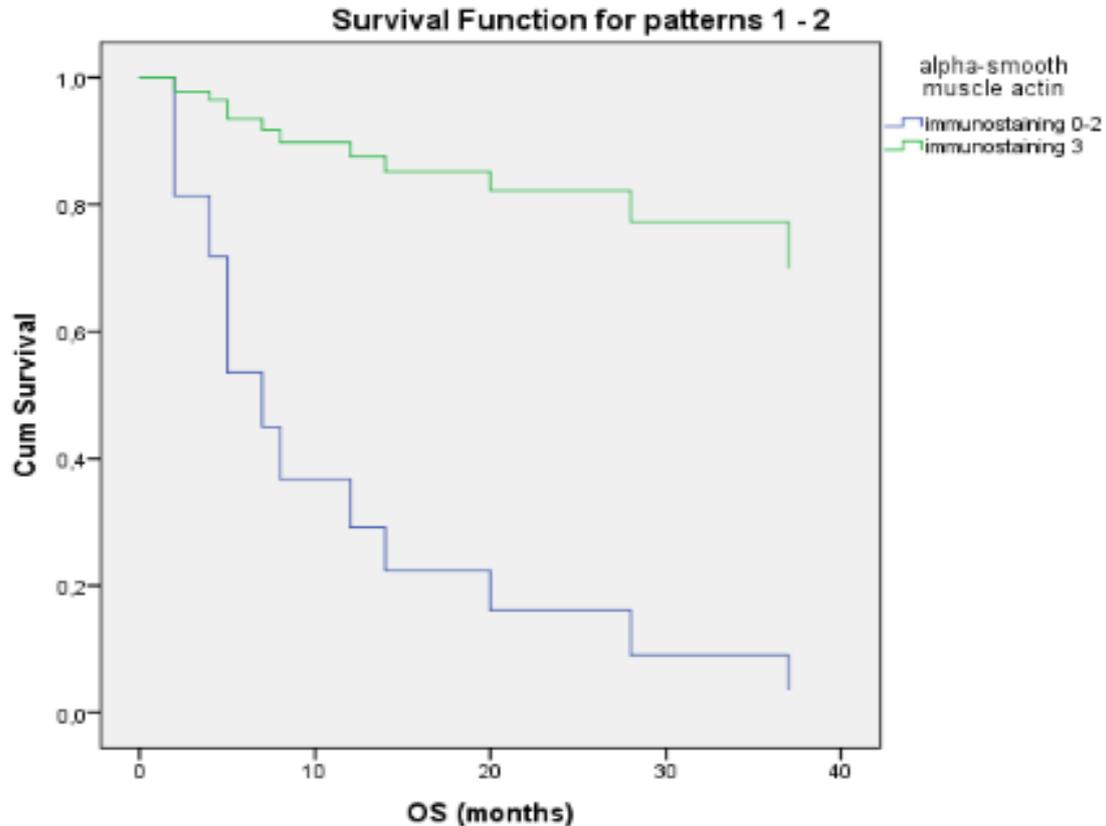
6 Após análise multivariada (regressão de Cox), pacientes com imunomarcção 3  
 7 estromal de  $\alpha$ -SMA tiveram maior SG em relação à imunomarcção 0, 1 ou 2 ( $p=0.015$ )  
 8 (Tabela 4; Figura 2).

**Tabela 4:** Análise univariada (método de Kaplan-Meier e o teste de *log-rank*) e análise multivariada (regressão de Cox) das variáveis idade, grau histológico, estadiamento, metástase de linfonodo e imunocoloração estromal  $\alpha$ -SMA considerando câncer epitelial de ovário e sobrevida global.

Variável	Análise Univariada ( <i>log-rank test</i> )	Análise Multivariada	
	Valor de p	OR (95% CI)	valor de p
Idade (> 50y vs $\leq$ 50y)	0.962	0.886 (0.210-3.735)	0.870
Grau Histológico (3 vs 1/2)	0.717	0.494 (0.119-2.057)	0.332
Estadiamento (III-IV vs I-II)	0.691	0.731 (0.192-2.781)	0.646
Metástase linfonodal (sim vs não)	0.131	5.954 (0.936-37.878)	0.059
Imunomarcção de $\alpha$ -SMA (score 3 vs scores 0-2)	<b>0.017</b>	0.107 (0.018-0.649)	<b>0.015</b>

Fonte: A Autora

**Figura 2.** Sobrevida global e imunocoloração estromal de  $\alpha$ -SMA (regressão de Cox).



1 Em relação às pacientes com tumores ovarianos *borderline*, a mediana da idade  
 2 foi de 48 (21-71) anos e a mediana da paridade foi de 2 (0-7) nascimentos. Em relação às  
 3 mulheres com neoplasias malignas do ovário, a mediana da idade foi de 55 (25-81) anos  
 4 e a mediana da paridade foi de 2 (0-12) partos.

5 Em relação ao status hormonal de pacientes com neoplasias ovarianas malignas,  
 6 21 (75%) pacientes estavam na menopausa e 7 (25%) estavam na menacme. Em relação  
 7 ao grupo de neoplasias ovarianas *borderline*, 10 (55,6%) pacientes estavam na menopausa  
 8 e 8 (44,4%) pacientes estavam na menacme.

9 Em relação ao estadiamento dos tumores das pacientes com diagnóstico de  
 10 neoplasia maligna de ovário, de 28 pacientes analisadas: 7 (25%) apresentaram  
 11 estadiamento IA, 1 (3,5%) estadiamento IB, 1 (3,5%) estadiamento IC-2, 1 (3,5%)  
 12 estadiamento IC-3, 1 (3,5%) estadiamento IIA, 1 (3,5%) estadiamento IIB, 1 (3,5%)  
 13 estadiamento IIIA-1(ii), 1 (3,5%) estadiamento IIIA-2, 1 (3,5%) estadiamento IIIB, 10  
 14 (37%) apresentaram estadiamento IIIC, e 3 (10%) pacientes apresentaram estadiamento  
 15 IV-B. Ademais, de acordo com o estadiamento das pacientes com diagnósticos de tumores

1 ovarianos borderline , de 18 pacientes analisadas: 14 (77.8%) apresentaram estadiamento  
 2 IA, 1 (5,5%) estadiamento IB, 1 (5,5%) estadiamento IC-2, 1 (5,5%) estadiamento IIB e  
 3 1 (5,5%) estadiamento IIIC.

4 A Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias malignas de ovário  
 5 estão listadas na tabela 5.

**Tabela 5** - Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias Malignas de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

<b>Grupo Neoplasias Malignas de ovário (n=28)</b>		
	n	%
Cistoadenocarcinoma papilífero seroso	18	64,3
Cistoadenocarcinomas	5	17,8
Cistoadenocarcinoma mucinoso	3	10,7
Adenocarcinoma endometrióide	1	3,6
Carcinoma de células claras	1	3,6

Fonte: A autora.

6 A Classificação Histológica das pacientes com tumores *Borderline* de ovário  
 7 estão listadas na tabela 6.

**Tabela 6** - Classificação Histológica das pacientes com Neoplasias *Borderline* de Ovário atendidas no Ambulatório de Massa Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, no período de 1997-2020.

<b>Grupo Neoplasias <i>Borderline</i> de ovário (n=18)</b>		
	n	%
Tumor mucinoso <i>borderline</i>	12	66,7
Tumor seroso <i>borderline</i>	5	27,8
Tumor endometrióide proliferativo atípico <i>borderline</i>	1	5,6

Fonte: A autora.

## 7. DISCUSSÃO

O microambiente tumoral e o estroma desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer e metástases. As células cancerosas presentes no microambiente tumoral podem desencadear uma contribuição direta para a alteração do estroma local. Essas células malignas podem manipular o microambiente de forma funcional por meio de secreções recorrentes de inúmeras quimiocinas, citocinas e outros fatores. Elas fornecem a reprogramação de células adjacentes, fornecendo um suporte e mecanismo de desenvolvimento do tumor. Também é importante destacar o papel das células imunes presentes no microambiente e que participam ativamente de todo o processo de evolução tumoral. Evidências significativas indicam que o desempenho das células imunes inatas e adaptativas também promove a progressão do tumor e eventos metastáticos. Além disso, os fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células abundantes no microambiente tumoral, funcionam secretando citocinas e também manifestando características tumorigênicas (ZHANG & HWANG, 2019; HINSHAW & SHEVDE, 2019).

A FAP é caracterizada por sua alta expressão no estroma tumoral. Sua expressão é difícil de detectar quando não há processo patológico (NURMIK et al., 2020), mas é detectada de forma significativa em sítios de imunomodulação tecidual em diversos tumores. A FAP é uma proteína emergente em vários estudos de terapias-alvo e também foi detectada mediante expressão significativa em processos de imunomodulação tecidual que inclui: fibrose hepática, fibrose pulmonar, artrite, aterosclerose, tecidos embrionários e em diversos tumores, no entanto a FAP ainda precisa ser melhor estudada (HAMSON et al., 2014). Além disso, a FAP foi identificada como uma proteína de interesse em vários estudos de imunoterapias direcionadas para certos carcinomas, principalmente em células cerebrais, especificamente células da glia (EBERT et al., 2020), como também tornou-se um alvo potencial para imunoterapias para alguns carcinomas como : carcinomas de pâncreas, pulmão, próstata, cabeça e pescoço e uma manifestação de mesotelioma, (OSTERMANN et al., 2008; SCHUBERTH et al., 2013). Em terapias relacionadas ao câncer de ovário, a imuno-histoquímica mostrou que a imunomarcagem foi mais forte em tecidos cancerosos em comparação com amostras de tecidos de neoplasias *borderline* e benignas. Tais achados reafirmam o papel fundamental dos CAFs no processo de carcinogênese e metástase do câncer de ovário, o que é reafirmado pela alta expressão de FAP em neoplasias malignas e baixa ou nula expressão em processos não patológicos

1 (ZHANG et al., 2015; NURMIK et al., 2020). Em nosso estudo, encontramos  
2 imunomarcação forte de FAP no câncer epitelial de ovário do que em tumores *borderline*.

3 A busca por outros marcadores estromais é extremamente relevante para a  
4 compreensão do mecanismo interativo do microambiente estroma-tumoral do câncer.  
5 Assim, a  $\alpha$ -SMA, que é membro da família das actinas, é caracterizada como um grupo  
6 de proteínas que desempenha importante papel na integridade muscular, motilidade e  
7 estrutura celular, também é conhecida por seu papel na cicatrização de feridas. É um dos  
8 principais fatores na contratilidade do miofibroblasto, por meio da regulação das fibras.  
9 Devido a esses fatores, a  $\alpha$ -SMA tornou-se um dos marcadores de referência para a  
10 identificação de populações CAF. Além disso, a expressão de  $\alpha$ -SMA também foi  
11 associada como um fator prognóstico significativo em pacientes com alguns tumores  
12 (SUN et al., 2016; ANGGOROWATI et al., 2017; CHERNG et., 2008; SHINDE et al.,  
13 2017).

14 A expressão de  $\alpha$ -SMA foi correlacionada com um risco aumentado de recorrência  
15 em pacientes com câncer de cólon e a alta expressão de fibroblastos positivos para  $\alpha$ -  
16 SMA foi fortemente associada a uma sobrevida global mais baixa em cânceres de cólon  
17 e de mama (WADA et., 2020; SUROWIAK et., 2007). A abundância de miofibroblastos  
18 no estroma associado ao câncer, que são fibroblastos especificamente diferenciados, foi  
19 um indicador útil de recorrência da doença após cirurgia curativa de câncer colorretal  
20 (TSUJINO et al., 2007), e a alta expressão de  $\alpha$ -SMA no estroma tumoral foi associada a  
21 pior evolução do paciente no câncer pancreático (SINN et al., 2014).

22 Um estudo demonstrou que a área de coloração de  $\alpha$ -SMA e FAP no câncer de  
23 ovário foi maior no estadiamento mais avançado (III e IV) e na presença de metástases  
24 em linfonodos (ZHANG et al., 2011). Apesar da associação da imunoexpressão desses  
25 marcadores com fatores de mau prognóstico, não encontramos na literatura estudos  
26 associando a imunomarcação de  $\alpha$ -SMA e a sobrevida global no câncer de ovário. Nosso  
27 estudo, por meio de uma análise multivariada, demonstrou uma sobrevida global mais  
28 longa em pacientes com imunocoloração estromal mais forte de  $\alpha$ -SMA.

29 Estudos têm demonstrado a contribuição dos CAFs na promoção direta da  
30 tumorigênese por meio de vários mecanismos, incluindo proliferação, invasão,  
31 sobrevivência e imunossupressão (KALLURI & ZEISBERG, 2006; FRANCO et al.,  
32 2010; OSTMAN & AUGSTEN, 2009). Ficou evidente também a participação dos CAFs  
33 no suporte estrutural e funcional do microambiente tumoral pelo mecanismo interativo  
34 com as células tronco-mesenquimais, potencializando ainda mais a tumorigênese

1 (SPAETH et al., 2009). Paralelamente, análises genéticas realizadas através da cultura dos  
2 osteoclastos da medula óssea, indicou positividade para a presença de FAP, implicando  
3 na contribuição direta dos CAFs, especificamente a FAP, no processo de tumorigênese do  
4 mieloma (GE et al., 2006). Ademais, outros estudos anteriores demonstraram o papel da  
5 expressão de FAP estromal associada à progressão do tumor, agressividade da doença e o  
6 desenvolvimento potencial de metástases, recorrência e morte em câncer de cólon e  
7 pancreático (COHEN et al., 2008; SHI et al., 2012; HENRY et al., 2007). E através de  
8 todos as descobertas e análises relacionadas à FAP, notou-se que a mesma é um potencial  
9 marcador estromal indicativo de crescimento tumoral. Assim, é importante correlacionar  
10 o papel da PAF em relação aos fatores prognósticos.

11 Outras análises também mostraram que a alta expressão de FAP em cânceres de  
12 ovário tratados com citorredução seguida de quimioterapia mostrou uma associação de  
13 FAP com doença avançada, metástase de linfonodo, envolvimento omental, doença  
14 linfovascular e aumento da angiogênese (ZHANG et al., 2011).

15 No entanto, em nosso estudo, não encontramos nenhuma relação entre a  
16 imunomarcção FAP e a sobrevida.

17 Nosso estudo demonstrou, por meio de imunohistoquímica, que a expressão de  
18 FAP no estroma peritumoral é maior no câncer epitelial de ovário quando comparado aos  
19 tumores *borderline* de ovário. Isso sugere que a FAP pode desempenhar um papel mais  
20 importante na carcinogênese e na progressão do tumor. Por outro lado, houve uma maior  
21 SG em pacientes com imunomarcção estromal 3 de  $\alpha$ -SMA, sugerindo um papel para  
22 esse marcador no prognóstico e na sobrevida. Apesar das limitações de nosso estudo,  
23 como a avaliação não separada dos tipos 1 e 2 de cânceres epiteliais de ovário, não há  
24 precedentes em demonstrar que  $\alpha$ -SMA é um fator independente relacionado à sobrevida  
25 global em tumor maligno de ovário. Assim,  $\alpha$ -SMA pode ser um objeto potencial de  
26 estudos para terapias alvo para câncer epitelial de ovário.

## 27 8. CONCLUSÃO

28 A imunomarcção da FAP foi mais forte no câncer epitelial de ovário comparado  
29 com os tumores ovarianos *borderline*. Avaliando apenas pacientes com câncer epitelial  
30 de ovário, houve um maior SG em pacientes com imunomarcção estromal 3(forte) de  $\alpha$ -  
31 SMA.

## REFERÊNCIAS

AGHAJANIAN, C. et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**. v. 30, n. 17, p. 2039-45, 10 jun. 2012.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes & development**. v. 22, n. 10, p. 1276-312, 15 mai. 2008.

ANGGOROWATI, N.; et al. Histochemical and Immunohistochemical Study of  $\alpha$ -SMA, Collagen, and PCNA in Epithelial Ovarian Neoplasm. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**. v. 18. N. 3, p. 667-671, 1 mar. 2017.

ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; BETSHOLTZ, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. **Developmental cell**. v. 21, n. 2, p. 193-215, 16 ago. 2011.

ATTIEH, Y. et al. Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- $\beta$ 3-dependent fibronectin assembly. **The Journal of cell biology**. v. 216, n. 11, p. 3509-3520, 6 nov. 2014.

AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. **Frontiers in oncology**. v. 4, n. 62, s.p. 27 mar. 2014.

BAE, S. et al. Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. **British journal of haematology**. v. 142, n. 5, p. 827-30, set. 2008.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**. v. 357, n. 9255, p. 539-45, 17 fev. 2001.

BERKENBLIT, A.; CANNISTRA, S.A. Advances in the management of epithelial ovarian cancer. **The Journal of reproductive medicine**. v. 50, n. 6, p. 426-38, jun. 2005.

BREMNES, R.M. et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. **Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**. v. 6, n. 1, p. 209-17, jan. 2011.

BRUCHARD, M. et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. **Nature Medicine**. v. 19, n. 1, p. 57-64, jan. 2013.

BURGER, R.A.; BRADY, M.F.; BOOKMAN, M.A.; FLEMING, G.F.; MONK, B.J.; HUANG, H. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian

cancer. **The New England journal of medicine**. v. 365, n. 26 p. 2473–2483, 29 dez. 2011.

CHAFFER, C.L.; WEINBERG, R.A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**. v. 331, n. 6024, p. 1559-64, 25 mar. 2011.

CHANG, H.Y. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 20, p. 12877-82, 1 out. 2002.

CHERNG S, YOUNG J, MA H. Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). **The journal of American Science**. v. 4, n. 4, p. 7-9, jan. 2008.

CIRRI, P.; CHIARUGI, P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. **American journal of cancer research**. v. 1, n. 4, p. 482-97, 2011.

COBURN, S.B. BRAY, F.; SHERMAN, M.E.; TRABERT, B. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. **International journal of cancer**. v. 140, n. 11, p. 2451-2460, 21 mar. 2017.

COHEN, S.J. Fibroblast activation protein and its relationship to clinical outcome in pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas**. v. 37, n. 2, p. 154-8, ago. 2008.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, n. 6917, p. 860-7, 19-26 dez. 2002.

COLVIN, E.K. Tumor-associated macrophages contribute to tumor progression in ovarian cancer. **Frontiers in oncology**. s.v, n. 4, p. 137, 6 jun. 2014.

DA SILVA, A.C.; JAMMAL, M.P.; ETCHEBEHERE, R.M.; MURTA, E.F.C.; NOMELINI, R.S. Role of Alpha-Smooth Muscle Actin and Fibroblast Activation Protein Alpha in Ovarian Neoplasms. **Gynecologic and obstetric investigation**. v. 83, n. 4, p. 381-387, 2018.

DIRKX, A.E.; OUDE EGBRINK, M.G.; WAGSTAFF, J.; GRIFFIOEN, A.W. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. **Journal of leukocyte biology**. v. 80, n. 6, p. 1183-96, dez. 2006.

DONNEM, T.; AL-SHIBLI, K.; AL-SAAD, S.; BUSUND, L.T.; BREMNES, R.M. Prognostic impact of fibroblast growth factor 2 in non-small cell lung cancer: coexpression with VEGFR-3 and PDGF-B predicts poor survival. **Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**. v. 4, n. 5, p. 578-85, mai. 2009.

EBERT, L.M. et al. Endothelial, pericyte and tumor cell expression in glioblastoma identifies fibroblast activation protein (FAP) as an excellent target for immunotherapy. **Clinical & translational immunology**. v. 9, n. 10, p. e1191, 14 out. 2020.

EGEBLAD, M.; RASCH, M.G., WEAVER, V.M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current opinion in cell biology**. v. 22, n. 5, p. 697-706, out. 2010.

EO, W.K. et al. Diagnostic accuracy of inflammatory markers for distinguishing malignant and benign ovarian masses. **Journal of Cancer**. v. 9, n. 7, p. 1165-1172., 8 mar. 2018.

FERRARA, N. VEGF as a therapeutic target in cancer. **Oncology**. V. 69 Suppl, n. 3, p. 11-6, 2005.

FOLKMAN J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Annals of surgery**. v. 175, n. 3, p. 409-16, mar. 1972.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England journal of medicine**. v. 285, n. 21, p. 1182-6, 18 nov. 1971.

FOSTER, D.S.; JONES, R.E.; RANSOM, R.C.; LONGAKER, M.T.; NORTON, J.A. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. **Journal of clinical investigation insight**. v. 3, n. 18, p. e99911, 20 set. 2018.

FRANCO, O.E.; SHAW, A.K.; STRAND, D.W.; HAYWARD, S.W. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**. v. 21, n. 1, p. 33-9, fev. 2010.

FREEDMAN, R.S.; DEEVERS, M.; LIU, J.; WANG, E. Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). **Journal of translational medicine**. v. 2, n. 1, p. 23, 25 jun. 2004.

GE, Y.; ZHAN, F.; BARLOGIE, B.; EPSTEIN, J.; SHAUGHNESSY J, JR.; YACCOBY, S. Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival. **British journal of haematology**. v. 133, n. 1, p. 83-92, abr. 2006.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell and tissue research**. v. 314, n. 1, p. 15-23, out. 2003.

GLOBOCAN 2020 - International Agency for Research on Cancer (IARC)/Cancer Registries International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Lyon, France. v.1 p.2. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/25-Ovary-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2021.

GOFF, B.A. MANDEL, L.S.; MELANCON, C.H.; MUNTZ, H.G. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. **Journal of the American Medical Association**. v. 291, n. 22, p. 2705-12, 9 jun. 2004.

GUALANDRIS, A. et al. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. **Cell**

**growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research.** v. 7, n. 2, p. 147-60, fev. 1996.

HAMSON, E.J.; KEANE, F.M.; THOLEN, S.; SCHILLING, O.; GORRELL, M.D. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. **Proteomics. Clinical applications** v. 8, n. 5-6, p. 454-63, jun. 2014.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.** v. 86, n. 3, p. 353-64, 9 ago. 1996.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell.** v. 100, n. 1, p. 57-70, 7 jan. 2000.

HANSEN, J.M.; COLEMAN, R.L.; SOOD, A.K. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. **European journal of cancer.** v. 56, p. 131-143, 3 fev. 2016.

HASHIMOTO, Y.; SKACEL, M.; ADAMS, J.C. Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker? **The international journal of biochemistry & cell biology.** v. 37, n. 9, p. 1787-804, set. 2005.

HAUPTMANN, S.; FRIEDRICH, K.; REDLINE, R.; AVRIL, S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. **Virchows Archiv : an international journal of pathology.** v. 470, n. 2, p. 125-142, fev. 2017.

HENRY, L.R. et al. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.** v. 13, n. 6, p. 1736-41, 15 mar. 2017.

HINSHAW, D.C.; SHEVDE, L.A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer research.** v. 79, n. 18, p. 4557-4566, 15 set. 2019.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M.S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nature medicine.** v. 1, n. 2, p. 149-53, fev. 1995.

HUGHES, C.C. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. **Current opinion in hematology.** v. 15, n. 3, p. 204-9, mai. 2008.

INCA 2021. Tipos de câncer. Câncer de Ovário. <https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer-de-ovario>. Acesso em 10 de setembro de 2021.

JAMMAL, M.P.; MARTINS-FILHO, A.; SILVEIRA, T.P.; MURTA, E.F.; NOMELINI, R.S. Cytokines and Prognostic Factors in Epithelial Ovarian Cancer. **Clinical Medicine Insights. Oncology.** v. 2, n. 10, p. 71-6, ago. 2016.

JAWHARI, A.U. et al. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation in vitro. **The American journal of pathology**. v. 162(, n. 1, p. 69-80, jan. 2003.

JOYCE, J.A.; FEARON, D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. **Science**. v. 348, n. 6230, p. 74–80, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**. v. 119, s.n, p. 1420–1428, 2019.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews. Cancer**. v. 6, n. 5, p. 392-401, mai. 2006.

KELLY-GOSS, M.R. et al. Targeting pericytes for angiogenic therapies. **Microcirculation**. v. 21, n. 4, p. 345-57, mai. 2014.

KELLY, T.; HUANG, Y.; SIMMS, A.E.; MAZUR, A. Fibroblast activation protein- $\alpha$ : a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. **International review of cell and molecular biology**. v. 297, s,n, p. 83-116, 2012.

KENNY, H.A., KRAUSZ T., YAMADA S.D., LENGYEL E. Use of a novel 3d culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. **International journal of cancer**. v. 121, n. 7, p. 1463-72, 1 out. 2007.

KIM, K.J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**. v. 362, n. 6423, p. 841-4, 29 abr, 1993.

KLYMENKO, Y. et al. Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis. **Oncogene**. v. 36, s.n, p. 5840–5851, 2017.

KNOWLES, L.M.; GURSKI, L.A.; ENGEL, C.; GNARRA, J.R.; MARANCHIE, J.K.; PILCH, J. Integrin  $\alpha\beta 3$  and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. **Cancer research**. v. 73, n. 20, p. 6175–6184, 2013.

KURMAN, R.J.; Shih, IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. **The American journal of pathology**. v. 186, n. 4, p. 733-47, abr. 2016

LAI D, MA L, WANG F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. **International journal of oncology**. v. 41, n. 2, p. 541-50, ago. 2012.

LAU TS, et al. A loop of cancer-stroma-cancer interaction promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer via TNF $\alpha$ -TGF $\alpha$ -EGFR. **Oncogene**. v. 36, n. 25, p. 3576-3587, 22 jun. 2017.

LENGYEL, E. Ovarian cancer development and metastasis. **The American journal of pathology**. v. 177, n. 3, p. 1053-64, set. 2010.

LEVENTAL, K.R. et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. **Cell**. v. 139, n. 5, p. 891–906, 2009.

LI, J. et al. Synergistic effects of FGF-2 and PDGF-BB on angiogenesis and muscle regeneration in rabbit hindlimb ischemia model. **Microvascular research**. v. 80, n. 1, p. 10-7, jul. 2010.

LI, J. et al. FSCN1 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Through Increasing Snail1 in Ovarian Cancer Cells. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**. v. 49, n. 5, p. 1766-1777, 2018.

LINARES, P.M.; CHAPARRO, M.; GISBERT, J.P. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. **A review. Journal of Crohn's & colitis**. v. 8, n. 3, p. 183-90, 8 mar. 2014.

LOUGHRAN, E.A. et al. Aging Increases Susceptibility to Ovarian Cancer Metastasis in Murine Allograft Models and Alters Immune Composition of Peritoneal Adipose Tissue. **Neoplasia**. v. 20, n. 6, p. 621-631, jun. 2018.

LU, P.; WEAVER, V.M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**. v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012.

MABUCHI, S. et al. Maintenance treatment with bevacizumab prolongs survival in an in vivo ovarian cancer model. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 14, n. 23, p. 7781-9, 1 dez. 2008.

MANEGOLD-BRAUER, G. et al. The special role of ultrasound for screening, staging and surveillance of malignant ovarian tumors: distinction from other methods of diagnostic imaging. **Archives of gynecology and obstetrics**. v. 289, n. 3, p. 491-8, mar. 2014.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**. v. 454, n. 7203, p. 436-44, 24 jul. 2008.

MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer metastasis reviews**. v. 32, n. 1-2, p. 303-15, jun. 2013.

MATTE, I.; LANE, D.; LAPLANTE, C.; RANCOURT, C.; PICHÉ, A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. **American journal of cancer research**. v. 2, n. 5, p. 566-80, 2012.

MCHUGH, K.M.; CRAWFORD, K.; LESSARD, J.L. A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. **Developmental biology**. v. 148, n. 2, p. 442-58, dez. 1991.

MEDEIROS, L.R. et al. Accuracy of magnetic resonance imaging in ovarian tumor: a systematic quantitative review. **American journal of obstetrics and gynecology**. v. 204, n. 1, p. 67.e1-10., jan. 2011.

MEDINA, L.; RABINOVICH, A.; PIURA, B.; DYOMIN, V.; LEVY, R.S.; HULEIHEL, M. Expression of IL-18, IL-18 binding protein, and IL-18 receptor by normal and cancerous human ovarian tissues: possible implication of IL-18 in the pathogenesis of ovarian carcinoma. **Mediators of inflammation**. v. 2014, s.n, p. 914954, 2014.

MHAWECH-FAUCEGLIA, P. et al. Stromal Expression of Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP) Predicts Platinum Resistance and Shorter Recurrence in patients with Epithelial Ovarian Cancer. **Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society**. v. 8, n. 1, p. 23-31, abr. 2015.

MIWA, T. et al. Structure, chromosome location, and expression of the human smooth muscle (enteric type) gamma-actin gene: evolution of six human actin genes. **Molecular and cellular biology**. v. 11, n. 6, p. 3296-306, jun. 1991.

MIRON, R.J.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; HERNANDEZ, M.; CHOUKROUN, J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. **Tissue engineering. Part B, Reviews**. v. 23, n. 1, p. 83-99, 2017.

MOHAN, R.R.; GUPTA, R.; MEHAN, M.K.; COWDEN, J.W.; SINHA, S. Decorin transfection suppresses profibrogenic genes and myofibroblast formation in human corneal fibroblasts. **Experimental eye research**. v. 91, n. 2, p. 238-245, 2010.

MONK, B.J.; MINION, L.E.; COLEMAN, R.L. Anti-angiogenic agents in ovarian cancer: past, present, and future. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**. v. 27, n. Suppl 1, p. i33-i39, 2016.

MUNN, L.L. Cancer and inflammation. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine. v. 9, n. 2, p. 10.1002/wsbm.1370, mar. 2017.

MUÑOZ-CHÁPULI, R.; QUESADA, A.R.; ANGEL MEDINA, M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**. v. 61, n. 17, p. 2224-43, set. 2004.

MURTA, E.F.; DA SILVA, C.S.; GOMES, R.A.; TAVARES-MURTA, B.M.; MELO, A.L. Ultrasonographic criteria and tumor marker assay are good procedures for the diagnosis of ovarian neoplasia in preselected outpatients. **European journal of gynaecological oncology**. v.25, n.6, p.707-712, 2004.

MURTA, E.F.; NOMELINI, R.S. Early diagnosis and predictors of malignancy of adnexal masses. **Current opinion in obstetrics & gynecology**. v.18, n.1, p.14-19, 2006.

NAM, E.J. et al. Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: correlation between PET/CT, Doppler US, and CT or MRI. **Gynecologic oncology**. v. 116, n. 3, p. 389-94, mar. 2010.

NEZHAT, F.; DATTA, M.S.; HANSON, V.; PEJOVIC, T.; NEZHAT, C.; NEZHAT, C. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. **Fertility and sterility**. v. 90, n. 5, p. 1559-70, nov. 2008.

NOSSOV, V. et al. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? **American journal of obstetrics and gynecology**. v. 199, n. 3, p. 215-23, set. 2008.

NOY, R.; POLLARD, J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**. v. 41, n. 1, p. 49-61, 20 nov. 2014.

NURMIK, M.; ULLMANN, P.; RODRIGUEZ, F.; HAAN, S.; LETELLIER, E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. **International journal of cancer**. v. 146, n. 4, p. 895-905, 15 fev. 2020.

OSTERMANN, E. et al. Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 14, n. 14, p. 4584-92, 15 jul. 2008.

OSTMAN, A.; AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. **Current opinion in genetics & development** v. 19, n. 1, p. 67-73, fev. 2009.

OSTMAN, A.; HELDIN, C.H. PDGF receptors as targets in tumor treatment. **Advances in cancer research**. v. 97, s.n, p. 247-74, 2007.

OZBEK, S.; BALASUBRAMANIAN, P.G.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R.P.; ADAMS, J.C. The evolution of extracellular matrix. **Molecular biology of the cell**. v. 21, s.n, p. 4300-4305, 2010.

PARK, S.B.; KIM, M.J.; LEE, K.H.; KO, Y. Ovarian serous surface papillary borderline tumor: characteristic imaging features with clinicopathological correlation. **The British journal of radiology**. v. 91, n. 1088, p. 20170689, jul. 2018.

PASZEK, M.J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell**. v. 8, n. 3, p. 241-254, set. 2005.

POLGÁR, L. The prolyl oligopeptidase family. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**. v. 59, n. 2, p. 349-62, fev. 2002.

POLLARD, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature reviews. Cancer**. v. 4, n. 1, p. 71-8, jan. 2004.

POLLARD, J.W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews. Immunology**. v. 9, n. 4, p. 259-70, abr. 2009.

PUJADE-LAURAIN, E. et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**. v. 32, n. 13, p. 1302-8, 1 mai. 2014.

RADISKY, E.S.; RADISKY D.C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol.* **Journal of mammary gland biology and neoplasia**. v. 15, n. 2, p. 201-12, jun. 2010.

RAZA, A.; FRANKLIN, M.J.; DUDEK, A.Z. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. **American journal of hematology**. v. 85, n. 8, p. 593-8, ago. 2010.

RISAU, W. Differentiation of endothelium. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 9, n. 10, p. 926-33, jul. 1995.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**. v. 11, s.n, p. 73-91, 1995.

RØNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W.; BISSELL, M.J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiological reviews**. v. 76, n. 1, p. 69-125, jan. 1996.

ROVIELLO, G.; BACHELOT, T.; HUDIS, C.A. The role of bevacizumab in solid tumours: A literature based meta-analysis of randomised trials. **European Journal of Cancer**. v. 75, s.n, p. 245–258, abr. 2017.

RUAN, G.; YE, L.; LIU, G.; AN, J.; SEHOULI, J.; SUN, P. The role of bevacizumab in targeted vascular endothelial growth factor therapy for epithelial ovarian cancer: an updated systematic review and meta-analysis. **OncoTargets and therapy**. v. 11, s.n, p. 521-528, 23 jan. 2018.

RYNER, L. et al. Upregulation of Periostin and Reactive Stroma Is Associated with Primary Chemoresistance and Predicts Clinical Outcomes in Epithelial Ovarian Cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 21, n. 13, p. 2941-51, 1 jul. 2015.

SAAD, A.F.; HU, W.; SOOD, A.K. Microenvironment and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. **Hormones & cancer**. v. 1, n. 6, p. 277-90, dez. 2010.

SANTRA, M.; SKORSKI, T.; CALABRETTA, B.; LATTIME, E.C.; IOZZO, R.V. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 92, n. 15, p. 7016–7020, 1995.

SCANLAN, M.J. et al. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of

epithelial cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 91, n. 12, p. 5657-61, 7 jun. 1994.

SCHUBERTH, P.C. et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma by fibroblast activation protein-specific re-directed T cells. **Journal of translational medicine.** v. 11, s.n, p. 187, 12 ago. 2013.

SCHNITTERT, J.; BANSAL, R.; STORM, G.; PRAKASH, J. Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma: High potential targets for therapeutics and drug delivery. **Advanced drug delivery reviews.** v. 129, s.n, p. 37–53, abr. 2018.

SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science.** v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.

SEYNHAEVE, ALB. et al. Spatiotemporal endothelial cell - pericyte association in tumors as shown by high resolution 4D intravital imaging. **Scientific reports.** v. 8, n. 1, p. 9596, 25 jun. 2018.

SHANG, Y.; CAI, X.; FAN, D. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. **Current cancer drug targets.** v. 13, n. 9, p. 915-29, nov. 2013.

SHEPRO, D.; MOREL, N.M. Pericyte physiology. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.** v. 7, n. 11, p. 1031-8, ago. 1993.

SHIGA, K. et al. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. **Cancers.** v. 7, n. 4, p. 2443-58, 11 dez. 2015.

SHIH, IeM.; KURMAN, R.J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **The American journal of pathology.** v. 164, n. 5, p. 1511-8, mai. 2004.

SHINDE, A.V.; HUMERES, C.; FRANGOGIANNIS, N.G. The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease.** v. 1863, n. 1, p. 298-309, jan. 2017.

SICA, A.; ALESSANDRA, S.; ALBERTO, M. Tumor-Associated Macrophages: A Molecular Perspective. **International Immunopharmacology.** v. 2, n. 8, p. 1045–54, jul. 2002.

SINN, M. et al.  $\alpha$ -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.** v. 111, n. 10, p. 1917-23, 11 nov. 2014.

SKALLI, O. et al. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. **The Journal of cell biology.** v. 103, n. 6 Pt 2, p. 2787-96, dez. 1986.

SÖLÉTORMOS, G. et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines from the European Group on Tumor Markers. **International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society**. v. 26, n. 1, p. 43-51, jan. 2016

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation **Journal of leukocyte biology**. v. 86, n. 5, p. 1065-73, nov. 2009.

SPAETH, E.L. et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. **PLoS One**. v. 4, n. 4, p. e4992, 2009.

SPAW, M.; ANANT, S.; THOMAS, S.M. Stromal contributions to the carcinogenic process. **Molecular carcinogenesis**. v. 56, n. 4, p. 1199-1213, abr. 2017.

STAPOR, P.C. et al. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. **Journal of vascular research**. v. 51, n. 3, p. 163-74, 2014.

SUROWIAK, P. et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. **Anticancer research**. v. 27, n. 4C, p. 2917-24, jul-ago. 2007.

SUN, K.H. et al.  $\alpha$ -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF $\beta$  activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. v. 310, n. 9, p. L824-36, 1 mai. 2016.

TAN, H. et al. miR-382 inhibits migration and invasion by targeting ROR1 through regulating EMT in ovarian cancer. **International journal of oncology**. v. 48, n. 1, p. 181-90, jan. 2016.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. IARC Press: Lyon 2003.

THIERY, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature reviews. Cancer**. v. 2, n. 6, p. 442-54, jun. 2002.

TOMASEK, J.J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**. v. 3, n. 5, p. 349-63, mai. 2002.

TRACY, L.E.; MINASIAN, R.A.; CATERSON, E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Advances in wound care**. v. 5, n. 3, p. 119-136, 2016.

TSUJINO, T. et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 13, n. 7, p. 2082-90, 1 abr. 2007.

VANDEKERCKHOVE, J.; WEBER, K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. **Journal of molecular biology**. v. 126, n. 4, p. 783-802, 25 dez. 1978.

WADA, Y. et al. The inhibitory effect of TU-100 on hepatic stellate cell activation in the tumor microenvironment. **Oncotarget**. v. 11, n. 49, p. 4593-4604, 8 dez. 2020.

WANG, E. et al. Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 11, n. 1, p. 113-22, 1 jan. 2005.

WEYMOUTH, N.; SHI, Z.; ROCKEY, D.C. Smooth muscle  $\alpha$  actin is specifically required for the maintenance of lactation. **Developmental biology**. v. 363, n. 1, p. 1-14, 1 marc. 2012.

XU, M.; CAO, F.L.; LI, N.; GAO, X.; SU, X.; JIANG, X. Leptin induces epithelial-to-mesenchymal transition via activation of the ERK signaling pathway in lung cancer cells. **Oncology letters**. v. 16, n. 4, p. 4782-4788, out. 2018.

YAMAGUCHI, Y.; MANN, DM.; RUOSLAHTI, E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. **Nature**. v. 346, n. 6281, p. 281-284, 1990.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G.; LEHEMBRE, F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends in molecular medicine**. v. 13, n. 12, p. 535-41, dez. 2007.

YING, X. MicroRNA-125b Suppresses Ovarian Cancer Progression via Suppression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway by Targeting the SET Protein. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**. v. 39, n. 2, p. 501-510, 2016.

ZEPPERNICK, F.; MEINHOLD-HEERLEIN, I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. **Archives of gynecology and obstetrics**. v. 290, p. 839-842, 2014.

ZHANG, M. et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. **Journal of ovarian research**. v. 7, n. 19, s.p. 8 fev. 2014.

ZHANG, M.; XU, L.; WANG, X.; SUN, B.; DING, J. Expression levels of seprase/FAP $\alpha$  and DPPIV/CD26 in epithelial ovarian carcinoma. **Oncology letters**. v. 10, n. 1, p. 34-42, jul. 2015.

ZHANG, X.; HWANG, Y.S. Cancer-associated fibroblast stimulates cancer cell invasion in an interleukin-1 receptor (IL-1R)-dependent manner. **Oncology letters**. v. 18, n. 5, p. 4645-4650, nov. 2019.

ZHANG, Y. et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. **Cancer letters**. v. 303, n. 1, p. 47-55, 1 abr. 2011.

## ANEXO A

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

**Pesquisador:** Rosekeila Simões Nomelini

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 34770014.4.0000.5154

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

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

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 877.759

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

**Apresentação do Projeto:**

O câncer de ovário

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

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

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

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

**Bairro:** Nossa Sra. Abadia **CEP:** 38.025-100

**UF:** MG **Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3318-5776 **Fax:** (34)3318-5776 **E-mail:** cep@pesqpg.uftrn.edu.br

Continuação do Parecer: 877.759

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

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

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

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

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

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

Continuação do Parecer: 877.759

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

#### Citocinas

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

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

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

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

Continuação do Parecer: 877.759

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

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

#### Estroma em carcinoma epitelial de ovário

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

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

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

Continuação do Parecer: 877.759

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

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

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

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

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

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

**Bairro:** Nossa Sra. Abadia

**CEP:** 38.025-100

**UF:** MG **Município:** UBERABA

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

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

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

Continuação do Parecer: 877.759

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

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

**Objetivo da Pesquisa:**

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 877.759

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

pendências atendidas

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

pendências atendidas

**Recomendações:**

pendências atendidas

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

pendências atendidas

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

UBERABA, 19 de Novembro de 2014

---

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

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



## ANEXO C

**DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS EM IMUNOHISTOQUÍMICA  
NO ESTUDO**

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

## ANEXO D

### TAMPÕES E REAGENTES UTILIZADOS EM IMUNO-HISTOQUÍMICA

- ✓ Tampão Citrato pH 6.0:

2,1g de ácido cítrico + 1.000mL de água destilada.

Homogeneizar a solução e acertar o pH até 6.0, utilizando solução de Hidróxido desódio (NaOH a 2N). Conservar em temperatura ambiente.

- ✓ Tampão TRIS/EDTA pH 9.0:

0,09g de EDTA + 0,30g de TRIZMA BASE + 250 mL de água destilada. Homogeneizar a solução e acertar o pH até 9.0, utilizando solução de Hidróxido desódio (NaOH a 2N). Deve ser utilizada apenas no dia que for feita.

### TAMPÃO DE LAVAGEM PBS (*PHOSPHATE BUFFERED SALINE*) PH 7.2:

Solução Mãe: 81,7g de Cloreto de sódio, 2,69g de Fosfato de sódio dibásico  
10,5g de Fosfato de sódio monobásico heptahidratado

0. 5mL de Tween 20 (DAKO-51966).

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira. PBS de uso:

100mL de PBS (solução mãe) + 900mL de água destilada. Conservar a temperatura ambiente.

- ✓ Solução diluente para anticorpo primário (BSA):

2g de Albumina Bovina + 100 mL de PBS de usoOPÇÃO (DAKO-53022).

Homogeneizar a solução e conservar em geladeira.

- ✓ Solução de água oxigenada a 3%:

3mL de água oxigenada 30 volumes + 97mL de água destilada.