Bernardo Gomes de Lacerda Almeida

**Linfangiogênese e seu papel no diagnóstico
diferencial entre tumores mucinosos primários
e secundários do ovário**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Filomena Marino
Carvalho

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Bernardo Gomes de Lacerda

Linfangiogênese e seu papel no diagnóstico diferencial entre tumores mucinosos primários e secundários do ovário / Bernardo Gomes de Lacerda Almeida. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Filomena Marino Carvalho.

Descritores: 1.Adenocarcinoma mucinoso 2.Linfangiogênese 3.Neoplasias ovarianas 4.Metástase neoplásica 5.Diagnóstico diferencial 6.Microambiente tumoral 7. Vasos linfáticos 8.Imuno-histoquímica 9.Análise de microarranjos

USP/FM/DBD-171/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela segura orientação ao longo da vida e pela crença inabalável na educação como um bem precioso e inalienável, estimulando em mim a certeza de que a construção do conhecimento nunca está pronta.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Filomena Marino Carvalho** pela paciência e perseverança na minha capacidade, sempre me estimulando e servindo de exemplo como profissional e como pessoa.

À **Dra. Cristiane Rúbia Ferreira** pela contribuição generosa ao projeto de pesquisa que fundamenta esta tese.

À funcionária da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **Ana Lucia Lorente** pela constante presteza.

À minha amiga e irmã do coração **Dra. Cristiane Maria de Freitas Ribeiro** pelo júbilo com minhas conquistas e pelo apoio fraternal de sempre.

Ao **Dr. Roberto Antônio Pinto Paes** e demais colegas do Centro Integrado de Patologia da Beneficência Portuguesa de São Paulo pelo incentivo e por compreenderem os momentos de ausência durante este doutorado.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro através do processo número 2012/11833-0.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Tumores epiteliais mucinosos.....	17
3.2 Estrutura e desenvolvimento do sistema vascular linfático.....	24
3.3 Metástases linfáticas e linfangiogênese tumoral.....	32
4 MÉTODOS.....	39
4.1 Parecer da Comissão de Ética.....	41
4.2 Desenho do estudo.....	41
4.3 Critérios de inclusão.....	41
4.4 Casuística.....	42
4.5 Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA)	52
4.6 Técnica de imuno-histoquímica	53
4.7 Técnica morfométrica para contagem dos vasos	55
4.8 Análise estatística	57
5 RESULTADOS	59

6 DISCUSSÃO	69
--------------------------	-----------

7 CONCLUSÃO	75
--------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	79
--------------------------	-----------

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Carta da Comissão de Ética

APÊNDICE 2 – Relação das amostra dos TMA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang 1.	angiopoetina 1
Ang 2	angiopoetina 2
β -catenina	beta-catenina
BGLA	Bernardo Gomes de Lacerda Almeida
C-met	receptor do HGF
CA 125	antígeno de câncer 125
CA 19-9	antígeno de carboidrato 19-9
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCL 21	quimiocina 21
CCR 7	receptor de quimiocina 7
CDX-2	fator de transcrição que induz expressão de fenótipo intestinal
CEA	antígeno carcino-embrionário
CELS	células endoteliais linfáticas
CK7	citoqueratina 7
CK 20	citoqueratina 20
CRF	Cristiane Rúbia Ferreira
CXCL 12	quimiocina 12
CXCR 4	receptor de quimiocina 4
D2-40	anticorpo antipodoplanina
Dpc4	supressor tumoral
Dra	doutora
DVL	densidade vascular linfática
Eph B4	receptor de efrina B4
Ephrin B2	efrina B2
Fgf-2	fator de crescimento derivado de fibroblastos 2
Fgfr	receptor do fator de crescimento derivado de fibroblastos
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FMC	Filomena Marino Carvalho
Hep Par 1	anticorpo anti-antígeno específico de hepatócitos
Hgf	fator de crescimento hepatocítico
IC 95%	intervalo de confiança de 95%
Igf-1	fator de crescimento semelhante à insulina 1
Igf-2	fator de crescimento semelhante à insulina 2
Igfr	receptor do Igf
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IVL	invasão vascular linfática
Lyve 1	receptor endotelial de ácido hialurônico 1
MUC1	mucina de superfície celular 1
MUC2	mucina de superfície celular 2
MUC5AC	mucina de superfície celular 5AC
n	frequência
Neuropilin 2	receptor neuropilina 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	razão de chance (“odds ratio”)
<i>p</i>	probabilidade de erro alfa
p504S	proteína específica de tecido prostático
Pdgf	fator de crescimento derivado de plaquetas
Pdgfr	receptor do Pdgf
PVLP	plexo vascular linfático primário
Profa	Professora
Prox 1	gene regulador da diferenciação endotelial linfática
Rho	Coeficiente de correlação Ró de Spearman
SLP	sacos linfáticos primários
Tie 1	receptor de angiopoetina 1
Tie 2	receptor de angiopoetina 2
TMA	microarranjo de tecido
Vegf-a	fator de crescimento endotelial vascular A
Vegf-c	fator de crescimento endotelial vascular C
Vegf-d	fator de crescimento endotelial vascular D

Vegfr-1	receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1
Vegfr-2	receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2
Vegfr-3	receptor do fator de crescimento endotelial vascular 3

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
cm	centímetro
μm	micrometro
=	igual
+	mais
-	negativo
±	variação para mais e para menos
>	maior
<	menor
≤	menor ou igual
x	vezes
%	porcento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Invasão estromal do tipo infiltrativa	43
Figura 2	Invasão estromal do tipo multinodular	44
Figura 3	Invasão estromal do tipo expansivo/confluyente	45
Figura 4	Tipo celular mülleriano	46
Figura 5	Tipo celular intestinal	47
Figura 6	Tipo celular pilórico	48
Figura 7	Tipo celular indeterminado	49
Figura 8	Adenocarcinoma bem diferenciado/grau histológico 1	50
Figura 9	Adenocarcinoma grau histológico 2	51
Figura 10	Adenocarcinoma grau histológico 3	52
Figura 11	Vaso linfático marcado por D2-40 na imuno- histoquímica	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reagentes e métodos usados para as análises imuno-histoquímicas	55
Tabela 2	Distribuição dos 124 tumores mucinosos incluídos neste estudo	62
Tabela 3	Principais características dos 124 tumores ovarianos selecionados	63
Tabela 4	Comparação das características patológico-cirúrgicas entre tumores primários e secundários	64
Tabela 5	Características imuno-histoquímicas dos 124 tumores selecionados	65
Tabela 6	Comparação entre a densidade vascular linfática intratumoral e os outros indicadores utilizados na discriminação do sítio primário	67

RESUMO

Almeida BGL. *Linfangiogênese e seu papel no diagnóstico diferencial entre tumores mucinosos primários e secundários do ovário* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Metástases em ovário geralmente se apresentam como o primeiro sinal de doença, com o tumor primário não sendo imediatamente reconhecido. A diferenciação mucinosa é o fenótipo mais comum entre essas metástases. Em algumas situações, quando essa apresentação está associada a carcinomas metastáticos capazes de simular tumores ovarianos primários, essa configuração pode levar até mesmo patologistas experientes a diagnosticar incorretamente um depósito secundário como uma neoplasia primária. A maioria dos casos problemáticos pode ser resolvida correlacionando-se os dados clínicos, as características macroscópicas, os critérios de histologia e o perfil imuno-histoquímico, mas sempre haverá alguns casos com características sobrepostas. Levando-se em conta que a invasão linfovascular conspícua é uma das características que favorecem metástase, nós hipotetizamos que diferentes padrões de microdensidade vascular intratumoral poderiam nos ajudar na definição da origem primária ou secundária do tumor. Um total de 124 casos de tumores mucinosos de ovário foram selecionados, apresentando histologia “borderline” e maligna. Eles foram separados em dois grupos (primários ou metastáticos), classificados de acordo com as informações clínicas disponíveis, características macroscópicas e microscópicas, e perfil imuno-histoquímico realizado em amostras de tumores em microarranjo de tecido (TMA). A densidade vascular linfática (DVL) foi analisada quantificando-se espaços vasculares intratumorais identificados pela podoplanina, um marcador endotelial linfático. De acordo com os nossos resultados a DVL foi maior nas neoplasias primárias do que nas secundárias, mas, após análise multivariada, os melhores preditores de um tumor ser secundário foram tamanho de 10,0 cm ou menos (OR 9,4; IC 95% 1,2-69,2), bilateralidade (OR 51,5; IC 95% 7,1-370,2) e negatividade para CK7 (OR 64,8; IC 95% 9,4-447). De acordo com o conhecimento atual, a disseminação metastática não é um evento aleatório, mas um processo de várias etapas complexas e sequenciais, altamente organizado e tecido específico. É importante aprofundar a relação entre as células tumorais e seu microambiente porque as características moleculares envolvidas podem ser uma possível fonte de novos marcadores que podem permitir uma categorização mais precisa dos tumores mucinosos nos ovários.

Descritores: 1.Adenocarcinoma mucinoso 2.Linfangiogênese 3.Neoplasias ovarianas 4.Metástase neoplásica 5.Diagnóstico diferencial 6.Microambiente tumoral 7.Vasos linfáticos 8.Imuno-histoquímica 9.Análise de microarranjos.

SUMMARY

Almeida BGL. *Lymphangiogenesis and its role in the differential diagnosis between primary and secondary mucinous ovary tumors* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Ovarian metastases commonly present as the first sign of the disease, with the primary tumor not being immediately recognized. Mucinous differentiation is the most common phenotype among those metastases. In particular situations, when compounded by the known metastatic carcinomas capable of simulate primary tumors, this setting can lead even experienced pathologists to diagnose incorrectly a secondary deposit as a primary neoplasm. Correlating clinical data, macroscopic features, histology criteria and immunohistochemistry profile, can solve the majority of those problematic cases, but there will always be some cases in a gray zone with superimposed characteristics. Since conspicuous lymphovascular invasion is one of the characteristics favoring metastases, we hypothesized if different patterns of intratumoral vascular microdensity can help us in defining the tumor origin. A total of 124 cases of mucinous tumors in ovary were selected, presenting borderline and malignant histology. They were separated in two groups (primary and metastatic) classified according to the available clinical data, gross and microscopic features, and immunohistochemistry profile performed in tumor samples in tissue microarrays (TMA). The lymphatic vascular density (LVD) was analyzed using podoplanin, a lymphatic endothelial marker. According to our results LVD was greater in primary than in secondary neoplasms, but after multivariate analysis, the best predictors of a secondary deposit tumor were size 10,0 cm or less (OR 9.4; CI 95% 1.2-69.2), bilaterality (OR 51.5; CI 95% 7.1-370.2) and CK7 negativity (OR 64.8; CI 95% 9.4-447). According to actual knowledge metastatic dissemination is not a random event, but a complex and sequential multistep process, highly organized and tissue-specific. It is important to go deeper into the relation between tumor cells and their microenvironment because its molecular features may be a possible source of new markers that could allow a more precise categorization of mucinous tumors in the ovaries.

Descriptors: 1.Mucinous adenocarcinoma 2.Lymphangiogenesis 3.Ovarian neoplasias 4.Neoplastic metastasis 5.Differential diagnosis 6.Tumoral microenvironment 7.Lymphatic vessels 8.Immunohistochemistry 9.Microarray analysis.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é o sétimo câncer globalmente mais frequente entre as mulheres, com 238.719 novos casos estimados no ano de 2012, em todo o mundo, o que corresponde a 3,6% da incidência mundial de câncer no sexo feminino. Cerca de 50% dos casos se concentram em países desenvolvidos, principalmente nos do norte da Europa e América do Norte, fato esse, em grande parte, relacionado às baixas taxas de natalidade dessas populações. A doença também ocupou o sétimo lugar entre as causas de morte por câncer entre as mulheres no mundo, em 2012(1). No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde/INCA, para 2014 são esperados 5680 novos casos de câncer de ovário, totalizando 2,1% das neoplasias malignas em mulheres. É o oitavo câncer mais comum naquele grupo, porém responsável por um grande número de mortes quando comparado a outros tumores ginecológicos mais frequentes, como os cânceres de colo e corpo uterinos, o que se explica por três quartos deles serem diagnosticados em estágio avançado. Em 2011 foram registrados 3027 óbitos por essa neoplasia em todo o país. A Região Centro-Oeste apresenta uma incidência mais elevada que a média nacional – 6,96 contra 5,58 novos casos por 100.000 habitantes – com o câncer ovariano sendo o quinto mais comum entre as mulheres naquela região(2).

Os tumores ovarianos, assim como os de outros órgãos e tecidos, são tradicionalmente subclassificados de acordo com a sua histologia. A

classificação de tumores da Organização Mundial de Saúde (OMS), é a utilizada e universalmente aceita(3). Os três principais tipos histológicos, que englobam a quase totalidade dos cânceres primários de ovário, são: tumores do epitélio superficial-estroma, tumores do cordão sexual-estroma e tumores de células germinativas. Os tumores do epitélio superficial-estroma são subdivididos conforme a diferenciação histológica do seu componente epitelial, sendo os tipos mais importantes: seroso, mucinoso, endometriode, de células claras e de células transicionais.

Definir se um tumor mucinoso no ovário é primário ou metastático pode ser um exercício bem difícil, mesmo utilizando-se os critérios morfológicos já bem estudados e estabelecidos nesse diferencial, em conjunto com técnicas anatomopatológicas modernas empregadas na determinação do perfil antigênico expresso pelas células neoplásicas, como a imuno-histoquímica. Os tumores mucinosos primários não são tão frequentes como os serosos, totalizando aproximadamente 12-15% de todas as neoplasias ovarianas. A grande maioria é unilateral e raramente apresenta disseminação extra-ovariana ao diagnóstico. Dois terços são benignos (adenomas), 10-12% são proliferativos atípicos ("borderline") e cerca de 12-15% são malignos (adenocarcinomas)(4), esse último valor estando provavelmente superestimado já que se baseia em trabalhos publicados antes do reconhecimento de que alguns carcinomas metastáticos são capazes de simular tumores ovarianos primários, e cuja descrição na literatura se deu inicialmente na década de 1980(5, 6). Portanto, adenocarcinomas mucinosos primários do ovário são raros, quase

invariavelmente unilaterais e geralmente limitados ao ovário no momento do diagnóstico (estágio I da FIGO)(7). Metástases correspondem a aproximadamente 7-17% de todos os tumores ovarianos(8), sendo frequentemente bilaterais. Os locais de origem mais comuns são: cólon-retos, mama, estômago, endométrio, apêndice cecal, colo uterino, pâncreas e ductos biliares (excetuando-se linfomas e leucemias)(9). A diferenciação mucinosa é o fenótipo mais comumente encontrado entre essas metástases.

Como mencionado acima, a despeito dos critérios diagnósticos refinados e das modernas técnicas de apoio utilizadas na patologia cirúrgica, a dificuldade em se diferenciar um adenocarcinoma mucinoso primário de um metastático persiste em muitos casos. Metástases frequentemente se apresentam como o primeiro sinal da doença, com o tumor primário não sendo imediatamente detectado(10). Quando associados àqueles carcinomas metastáticos capazes de simular tumores ovarianos primários, essa apresentação pode levar mesmo patologistas experientes a diagnosticar equivocadamente um depósito secundário como neoplasia primária, o que acarretará muito provavelmente uma abordagem terapêutica incorreta, com sérias consequências para o paciente. Em tais situações, o uso de alguns critérios morfológicos é de grande utilidade na maioria dos casos, no entanto nenhum deles é patognomônico de natureza metastática(7). As principais características que favorecem depósito secundário são: bilateralidade, superfície de corte multinodular, invasão estromal à microscopia mostrando um padrão nodular, heterogêneo e infiltrativo/destrutivo, implantes tumorais na superfície ovariana, invasão

linfática ou vascular sanguínea, especialmente se conspícua, presença de células em anel de sinete e células neoplásicas em meio a lagos de muco(11, 12). Correlação com as informações clínicas também é importante. Além disso, o exame imuno-histoquímico pode contribuir quando associado à abordagem anteriormente citada. Por exemplo, um imunoperfil de citoqueratinas (CK) do tipo CK7-/CK20+ sugere origem cólon-retal, enquanto que um resultado CK7+/CK20- favorece ovário como sítio primário. Entretanto, essa técnica diagnóstica apresenta limitações, pois tumores ovarianos mucinosos primários podem expressar focalmente e, por vezes, difusamente CK20(13). De forma semelhante, adenocarcinomas do intestino grosso podem mostrar marcação focal ou multifocal para CK7, o que ocorre mais frequentemente em tumores pouco diferenciados e naqueles localizados no cólon direito ou reto(14). Para dificultar ainda mais, o imunofenótipo CK7+/CK20- também é visto nos adenocarcinomas originados no pâncreas, mama, estômago, pulmão, ductos biliares e trato genital feminino(15, 16). Devido a essa superposição, não é aconselhado usar a imuno-histoquímica de forma isolada ao se investigar se um tumor mucinoso no ovário é primário ou secundário. A abordagem correta é sempre correlacionar o resultado imuno-histoquímico com os dados clínicos e morfológicos. Mais recentemente, alguns novos marcadores imuno-histoquímicos tem sido usados em associação com as citoqueratinas (CK7 e CK20) com o propósito de aumentar a acurácia desse teste. Diversos marcadores, tais como CDX-2, β -catenina, p504S, Dpc4, MUC1, MUC2, MUC5AC e Hep Par 1, podem ser úteis, no entanto, mesmo contando com

todos esse arsenal ainda haverá os casos duvidosos. Portanto, a busca por novas ferramentas que possam ajudar a diferenciar se um tumor no ovário é primário ou secundário continua. Uma possibilidade é que diferentes padrões de microdensidade vascular possam nos dar uma pista, já que invasão linfovascular conspícua é uma das características que favorecem metástase(11, 12), e o compartimento estromal, onde os espaços linfovasculares estão localizados, é um importante componente dos tumores epiteliais ovarianos(17).

Há controvérsias sobre a existência de vasos linfáticos intratumorais funcionais e a capacidade de tumores em promover linfangiogênese(18). A formação de vasos linfáticos em alguns casos de câncer de cabeça e pescoço apresentou correlação positiva com metástase linfonodal e mau prognóstico(19, 20). Entretanto, vasos linfáticos intratumorais podem ser pouco funcionais e não essenciais para o processo metastático(21, 22). Na nossa experiência com câncer de vulva, colo uterino e endométrio, encontramos correlação inversa entre densidade vascular linfática (DVL) intratumoral e metástase para linfonodo e prognóstico(23-25). Na realidade, vasos linfáticos pré-existentes localizados nas adjacências de um tumor podem ser suficientes para o processo metastático(22). Tais vasos linfáticos são ativados por fatores de crescimento que causam vasodilatação, o que leva a um aumento no fluxo de linfa(26, 27). Um aspecto interessante é que os mesmos fatores de crescimento são capazes de promover linfangiogênese e hiperplasia sinusoidal em linfonodos regionais, mesmo antes das células tumorais terem acesso ao sistema linfático, o que poderia

se interpretado como se o tumor estivesse preparando um microambiente adequado para sua posterior disseminação(28-31). É tentador imaginar se o mesmo processo de preparação também não ocorreria em outros tecidos comumente afetados por depósitos metastáticos.

A podoplanina é um marcador endotelial linfático identificado recentemente. A associação entre expressão de podoplanina pelo estroma intratumoral e DVL foi observada em alguns tumores, inclusive ovarianos, o que reforça a estreita relação entre microambiente e linfangiogênese(32). Também foi notado que fibroblastos intratumorais em carcinomas ovarianos estão relacionados a linfangiogênese, angiogênese e prognóstico(33). Sundar et al. analisaram a DVL em 108 tumores ovarianos, mas esse dado não resultou em bom marcador prognóstico, talvez porque aqueles tumores não usem os sistemas linfático e vascular como sua principal fonte de disseminação(34). Fadare et al. não encontraram diferenças significativas quando compararam a DVL entre dois grupos de tumores ovarianos proliferativos atípicos, um com e o outro sem metástases linfonodais(35). Cada grupo continha 13 tumores, mas o tipo histológico estudado foi seroso ao invés de mucinoso.

De acordo com os conhecimentos atuais, podemos afirmar que a disseminação metastática não é um evento aleatório, mas sim um processo em múltiplas etapas que é extremamente complexo, altamente organizado e tecido-específico. Não há estudos comparando microambiente ou DVL entre tumores mucinosos ovarianos primários e secundários. Considerando o

problema no seu diagnóstico diferencial, nós nos propomos a investigar um possível papel da DVL em fazer desse um processo com maior acurácia.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Estudar a linfangiogênese em carcinomas mucinosos ovarianos primários e secundários através da análise quantitativa de vasos linfáticos marcados pelo anticorpo D2-40.

Comparar a densidade vascular linfática intratumoral com outros indicadores utilizados na discriminação do sítio primário (bilateralidade, tamanho do tumor, presença de necrose tumoral, expressão coordenada de citoqueratinas 7 e 20 e expressão imuno-histoquímica de CA125, CEA, CA19-9, MUC2 e MUC5AC), quanto a sua capacidade de discriminar neoplasias primárias de secundárias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Tumores epiteliais mucinosos

No início do século passado já havia se estabelecido a ideia de que a classificação dos cânceres de ovário deveria apoiar-se em princípios histológicos. Portanto, investigadores, com base no tipo celular, estabeleceram a categoria dos tumores epiteliais superficiais, dentre os quais se encontram os tumores mucinosos. Esses, entre as décadas de 1940 e 1960, eram geralmente subdivididos em três categorias: cistadenoma pseudomucinoso (benigno), carcinoma pseudomucinoso (maligno) e pseudomixoma ovariano e peritoneal(36), essa última categoria motivo de controvérsias quanto à benignidade ou malignidade devido ao aspecto histológico inocente associado geralmente a um curso clínico reservado(37). Durante esses anos, observou-se também a existência de um subgrupo de tumores epiteliais serosos não invasivos que apresentam atipias citológicas, implantes tumorais extra-ovarianos frequentes, porém com um curso clínico bem menos agressivo quando comparado com o dos carcinomas serosos francamente invasivos(36). Em decorrência do acúmulo desses conhecimentos, em 1973, na nova classificação dos tumores ovarianos publicada pela FIGO e OMS, uma categoria intermediária de tumores epiteliais foi criada. Essa nova categoria, um meio termo entre os polos

benigno e maligno, foi designada como “de baixo potencial de malignidade”, “de malignidade limítrofe” ou “borderline”(38, 39).

Com o objetivo de produzir uma classificação uniforme, a categoria “borderline” passou a ser utilizada para todos os subtipos de tumores epiteliais ovarianos. Dentre os tumores mucinosos, aqueles associados a pseudomixoma peritoneal passaram a ser imediatamente classificados como “borderline” a despeito de muito frequentemente suas células apresentarem um aspecto histológico inocente(36). Assim como nos tumores serosos, também passaram a ser chamados de “borderline” os tumores mucinosos que não apresentavam disseminação extra-ovariana, mas que continham focos de proliferação epitelial atípica no seu interior.

No caso dos tumores associados a pseudomixoma, a ideia de fazer uma analogia com as neoplasias serosas “borderline” e seus implantes peritoneais era natural.

Com o passar dos anos, no entanto, observou-se que as pacientes com tumores mucinosos “borderline” limitados aos ovários apresentam uma taxa de sobrevida a longo prazo excelente (próxima dos 100%), caracterizando um curso clínico predominantemente benigno(36). Contatou-se também que em relação aos tumores ovarianos associados a pseudomixoma peritoneal, quando se realiza uma investigação cuidadosa, em quase todos os casos encontra-se uma neoplasia mucinosa semelhante e concomitante no apêndice cecal(40).

A ausência de relatos na literatura de casos de pseudomixoma peritoneal causados por ruptura de um tumor mucinoso “borderline” antes ou durante uma cirurgia(36), associada às observações acima citadas, fez com que diversos trabalhos publicados durante a década de 1990 chegassem ao consenso de que, nos casos de pseudomixoma peritoneal, os tumores ovarianos concomitantes são, na verdade, metástases de um tumor primário do trato gastrointestinal (mais frequentemente do apêndice cecal), e que a condição pseudomixoma está associada exclusivamente a essas neoplasias gastrointestinais, sendo uma forma de disseminação das mesmas(40-44).

Relatos, iniciados na década de 1980, também revelaram vários casos de adenocarcinomas mucinosos metastáticos em ovário com a capacidade de mimetizar morfológicamente tumores mucinosos primários desse órgão, levando a possíveis erros de diagnóstico. Nesses casos, as metástases são frequentemente mal interpretadas como neoplasia primária por apresentarem, na microscopia, áreas de epitélio muito bem diferenciado (“fenômeno de maturação”) ao lado de áreas de aspecto maligno, rememorando assim o típico espectro morfológico das neoplasias mucinosas primárias (áreas com caracteres de adenoma, neoplasia “borderline” e adenocarcinoma na mesma lesão), o que pode confundir até mesmo ginecopatologistas experientes(45). Para complicar ainda mais o cenário, essas metástases são geralmente maiores que as neoplasias que lhes dão origem(36), podendo ser a primeira manifestação da doença, o que dificulta mais ainda a sua correta interpretação como foco secundário. Os sítios de

origem mais citados dessas metástases que mimetizam neoplasia primária são intestino, pâncreas, vias biliares, estômago e colo uterino(43, 46-50).

Portanto, nas últimas três décadas houve uma considerável redução do número de tumores mucinosos primários ovarianos diagnosticados como malignos devido a três fatores: introdução da categoria das neoplasias “borderline”, identificação de adenocarcinomas metastáticos que se assemelham morfológicamente a tumores mucinosos primários do ovário e a recente interpretação de que a maioria dos tumores mucinosos ovarianos associados a pseudomixoma peritoneal corresponde, na verdade, à metástase de um primário localizado no apêndice cecal(5, 51).

De acordo com a literatura, os tumores mucinosos perfazem 12-15% de todas as neoplasias ovarianas, apresentam baixa incidência de bilateralidade (menos que 12%) e raramente se associam a disseminação extra-ovariana no momento do diagnóstico. Os adenomas contribuem com cerca de dois terços de todos os tumores mucinosos, ficando os tumores “borderline” responsáveis por 10-12% e os adenocarcinomas por 12-15%(4). Acredita-se ainda que este último valor esteja superestimado em decorrência de ter sido baseado em estudos publicados antes do reconhecimento dos carcinomas metastáticos capazes de mimetizar neoplasias primárias, como descrito anteriormente(5, 6). Desse modo, a grande maioria das neoplasias mucinosas ovarianas é de tumores benignos, sendo os adenocarcinomas mucinosos neoplasias raras, unilaterais, geralmente restritas ao ovário (estádio I da FIGO)(7).

A literatura também relata que aproximadamente 7-17% dos tumores envolvendo o ovário são metastáticos(8, 52), sendo que esses frequentemente são bilaterais. Os sítios de origem mais comumente citados são cólon-retos, mama, endométrio, estômago, colo uterino, pâncreas, apêndice cecal e vias biliares (excluindo-se linfomas e leucemias)(8, 9, 46, 47, 52, 53). O fenótipo mucinoso é o mais frequente na maior parte desses tumores.

Em muitos casos de metástase há o conhecimento da existência de uma neoplasia primária. Porém, em outras ocasiões, a apresentação clínica se dá através de sintomas relacionados a uma massa ovariana em uma paciente sem história conhecida de malignidade, podendo, em casos excepcionais, a neoplasia primária não ser identificada por meses ou até mesmo anos(10). Há também os já citados carcinomas metastáticos que causam dificuldades diagnósticas por simularem neoplasia primária ovariana. Quando esses dois fatores se associam, são grandes as chances de se diagnosticar erroneamente um foco secundário como primário. Nessas situações, o uso de alguns critérios morfológicos estabelecidos permite um diagnóstico diferencial confiável entre neoplasia primária e secundária. No entanto, é importante ressaltar que nenhuma dessas características é patognomônica de lesão metastática(7). Os principais achados que favorecem metástase são: bilateralidade, envolvimento macroscópico multinodular, invasão estromal de padrão infiltrativo, nodular e heterogêneo, presença de implantes tumorais na superfície ovariana, invasões vasculares sanguínea ou linfática extensas, presença de células em anel de sinete e de

células neoplásicas flutuando em lagos de muco(11, 12). A obtenção de uma história clínica completa também é de grande auxílio.

Se mesmo após essa abordagem persistir a dúvida (primário *versus* secundário), pode-se utilizar o estudo imuno-histoquímico. Em se tratando de metástase, essa técnica também é importante na orientação sobre a localização do provável sítio de origem. Inicialmente, o uso da marcação diferencial de citoqueratinas (CK7 e CK20) pode ser utilizado. Por exemplo, um imunofenótipo CK7-/CK20+ é extremamente sugestivo de uma origem cólon-retal, enquanto um padrão de marcação CK7+/CK20- favorece neoplasia primária do ovário(13). Entretanto, o exame imuno-histoquímico não deve ser avaliado isoladamente. Os achados devem ser interpretados com cautela e dentro de um contexto clínico, já que tumores mucinosos primários do ovário podem apresentar marcação focal ou, raras vezes, difusa para CK20(13). Da mesma forma, adenocarcinomas do intestino grosso podem expressar CK7. Essa expressão geralmente é focal ou multifocal, ocorre mais comumente nos tumores pouco diferenciados e naqueles localizados do lado direito(14), existindo ainda uma leve tendência dos tumores retais em apresentar uma positividade mais extensa que focal para esse marcador(54). O imunofenótipo CK7+/CK20- é também comum em adenocarcinomas pancreáticos, mamários, gástricos, pulmonares, do trato biliar e em outros adenocarcinomas do trato genital feminino(15, 16). Assim, complementarmente às citoqueratinas, devem ser usados outros anticorpos para ajudar à melhorar a sensibilidade e a especificidade do método, ampliando-se o painel imuno-histoquímico.

Nos últimos anos, vem se multiplicando o número de novos anticorpos que podem ser utilizados nos painéis, assim como as publicações a esse respeito. Novos marcadores como CDX-2(55-57), β -catenina(58), p504S(59), Dpc4(13), MUC1, MUC2, MUC5AC(13, 60-62) e Hep Par 1(63) podem permitir um diagnóstico mais preciso, ajudando a encurtar o tempo gasto na investigação diagnóstica, além de orientar condutas diagnósticas e terapêuticas mais adequadas.

Mais uma vez, entretanto, mesmo com todos esses recursos disponíveis, haverá aqueles casos em que a dúvida (primário *versus* secundário) permanecerá, já que algumas metástases podem compartilhar aspectos macroscópicos, microscópicos e também imuno-histoquímicos com as neoplasias primárias do ovário, simulando tumores mucinosos proliferativos atípicos ("borderline" tipo gastrointestinal ou tipo endocervical) e adenocarcinomas mucinosos ovarianos bem diferenciados.

Portanto, a busca por outros parâmetros que permitam estabelecer se uma neoplasia ovariana é primária ou secundária continua.

Uma possibilidade é a de que padrões diversos de linfangiogênese e disseminação linfática possam denunciar a qual das duas categorias pertence um determinado tumor.

Essa suspeita pode ser reforçada pelo fato da presença de invasão linfática extensa ser um dos critérios microscópicos utilizados em favor da natureza metastática de uma neoplasia no ovário(11, 12).

O estroma é importante componente nos tumores epiteliais ovarianos, particularmente nos carcinomas mucinosos. Um dos componentes importantes no estroma é a sua rede vascular sanguínea e linfática(17).

3.2 Estrutura e desenvolvimento do sistema vascular linfático

O sistema linfático é essencial na manutenção do equilíbrio hidrostático tecidual, na vigilância imunológica e na absorção de triglicerídeos e compostos lipofílicos liberados no intestino sob a forma de quilomicrons(64).

Embora o sistema vascular sanguíneo e o linfático sejam ambos revestidos por células endoteliais, eles diferem drasticamente entre si. O sistema vascular sanguíneo é um sistema circulatório fechado, no qual o coração bombeia sangue para todo o corpo através de artérias, capilares e veias. Em contrapartida, o sistema linfático é um sistema unidirecional, no qual a linfa flui a partir dos tecidos de volta à corrente sanguínea, tendo início nos capilares linfáticos teciduais, estruturas vasculares em fundo cego altamente permeáveis(65).

Ao contrário dos capilares sanguíneos, os capilares linfáticos são destituídos de membrana basal contínua e de revestimento por pericitos, apresentando uma parede delgada constituída apenas por camada única de células endoteliais contendo poros intercelulares(66), os quais permitem a

passagem de fluido, macromoléculas e células imunológicas, como as células dendríticas e de Langerhans(67).

As células endoteliais linfáticas (CEs) nos capilares ancoram-se na matriz extracelular através de fibras elásticas, denominadas filamentos de ancoragem. Estes filamentos mantêm os vasos patentes mesmo em situações de aumento da pressão hidrostática tecidual, expandindo o diâmetro luminal e permitindo assim a drenagem de um volume maior de fluido intersticial(68).

Muitas outras diferenças existem entre o sistema vascular sanguíneo e o sistema linfático. Na verdade as diferenças começam pela formação embriológica dos dois sistemas.

Nos últimos dez anos os conhecimentos sobre os mecanismos básicos da linfangiogênese têm sido aprofundados. Contribuíram para esse propósito a identificação de marcadores endoteliais linfáticos específicos, a descoberta de fatores de crescimento e seus receptores correspondentes, envolvidos de maneira crítica na regulação do crescimento e diferenciação dos vasos linfáticos, o conhecimento de técnicas de isolamento de populações de células endoteliais linfáticas e o desenvolvimento de modelos animais para o estudo dos vasos linfáticos e das metástases linfáticas.

O conhecimento detalhado dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na embriologia, fisiologia e patologia dos vasos linfáticos é importante no desenvolvimento de métodos eficientes de prevenção,

diagnóstico, e terapêutica de inúmeras doenças, com destaque para os diversos tipos de câncer.

O desenvolvimento de novos vasos linfáticos, conhecido como linfangiogênese, ocorre de forma fisiológica durante a formação do sistema linfático no embrião, mas também está associada a eventos patológicos, como nas neoplasias, na regeneração tecidual, na cicatrização de feridas do diabete e nos enxertos de transplantes(18).

No embrião, o desenvolvimento do sistema linfático ocorre logo após a formação do sistema cardiovascular. As CELs derivam de uma subpopulação distinta de células endoteliais venosas localizadas na parede anterior da veia cardinal, na região jugular. Essas células endoteliais, num dado momento, se comprometem com a linhagem linfática, o que é caracterizado pela expressão de algumas moléculas (Lyve 1, Prox 1 e Vegfr-3)(69).

Estimuladas pelo fator de crescimento endotelial vascular C (Vegf-c), secretado pelo tecido adjacente, essas células passam a proliferar e migram para formar estruturas saculares conhecidas como sacos linfáticos primários (SLP)(70). A partir dessas estruturas brotam vasos linfáticos que vão formar o plexo vascular linfático primário (PVLP), o qual, por fim, se separa do sistema sanguíneo. Subsequentemente, vários sacos linfáticos são formados próximos das principais veias em diferentes regiões do embrião, repetindo o mesmo processo e fazendo com que a vasculatura periférica seja gerada através do brotamento centrífugo de vasos. Após a formação de plexos

vasculares linfáticos por todo o embrião, esses se fundem, passando então por remodelação e maturação para formar a rede hierarquizada de capilares linfáticos e os vasos linfáticos coletores(69).

Uma segunda teoria sugere que as CELs derivam de células progenitoras mesenquimais(71). Já foram observados linfangioblastos em pássaros e anfíbios, mas a existência dessas células em mamíferos é incerta(72, 73).

Após a formação e maturação do sistema linfático as CELs ficam normalmente em um estado quiescente, porém competentes para responder a uma variedade de estímulos. No adulto, novos vasos linfáticos crescem a partir do brotamento dos vasos linfáticos já existentes na região(18).

Outra teoria sugere a existência de células progenitoras circulantes, derivadas da medula óssea, capazes de se diferenciarem em CELs, já que foram identificadas CELs originadas do hospedeiro em vasos linfáticos de rins transplantados com inflamação(74). Há também a possibilidade de ocorrer transdiferenciação de macrófagos em CELs, sugerida pela observação de vasos linfáticos neoformados nas córneas com inflamação em experimentos com rato(75).

De forma similar ao que ocorre na angiogênese, a linfangiogênese é regulada por um grande número de fatores de crescimento e outras moléculas. Cada um deles atua em fases específicas do processo, desde a proliferação das células endoteliais que darão origem aos sacos linfáticos

até a remodelação, maturação e diferenciação hierarquizada dos vasos recém-formados.

Os primeiros indícios da diferenciação linfática numa célula endotelial são a expressão das moléculas Lyve 1, Prox 1 e Vegfr-3(69).

Lyve 1 (receptor endotelial de ácido hialurônico 1) é o marcador mais precoce de diferenciação endotelial linfática(69), mas sua expressão não é indispensável para o desenvolvimento ou função normais do sistema linfático(76). Pensa-se que esse receptor esteja relacionado à renovação de ácido hialurônico ou ao tráfego leucocitário(77).

Prox 1 é o principal regulador da diferenciação endotelial linfática, detectado de forma restrita numa subpopulação de células endoteliais venosas na região anterior da veia cardinal, sendo sua expressão seguida do brotamento e migração dessas células para a formação dos sacos linfáticos(78). A sua não expressão acarreta o brotamento das células endoteliais de forma não polarizada, além da interrupção da migração das mesmas(78, 79). Já a sua superexpressão em células endoteliais vasculares sanguíneas humanas inibe a expressão de diversos genes específicos para CELs, o que sugere um papel de gene controlador principal, o qual determina o destino das CELs(80, 81).

O Vegfr-3 (receptor do fator de crescimento endotelial vascular 3) é um receptor tirosinoquinase expresso nas células endoteliais vasculares sanguíneas na fase inicial da embriogênese, antes da formação do sistema linfático, atuando na remodelagem e maturação do plexo capilar

sanguíneo(82). Mais tarde na embriogênese, sua expressão diminui nos vasos sanguíneos e finalmente se torna restrita aos vasos linfáticos e a um tipo especializado de capilar sanguíneo fenestrado presente na medula óssea, sinusóides esplênicos e hepáticos, glomérulos renais e glândulas endócrinas(83). Tem papel importante na proliferação, migração e sobrevivência das CELs durante o desenvolvimento embriológico e mesmo no período pós-natal(84, 85). Seus principais ligantes são o Vegf-c e o Vegf-d(86, 87).

O fator de crescimento endotelial vascular C (Vegf-c) é essencial para o brotamento dos primeiros vasos linfáticos, migração direcionada e sobrevida das CELs, atuando através do Vegfr-3(70). Também é ligante do Vegfr-2, com papel secundário na angiogênese(88).

O fator de crescimento endotelial vascular D (Vegf-d) não é essencial na linfangiogênese embrionária, tendo um papel mais importante na linfangiogênese no adulto, atuando através do Vegfr-3(89). Também é ligante do Vegfr-2, com papel secundário na angiogênese(88).

Os receptores Vegfr-1 e Vegfr-2 são expressos predominantemente em células endoteliais sanguíneas e tem importante papel na angiogênese. Também expressos em CELs, porém com papel menor na linfangiogênese. O principal ligante dos dois é o Vegf-a(90).

O fator de crescimento endotelial vascular A (Vegf-a), também conhecido como fator angiogênico primário, atua na angiogênese embrionária através do Vegfr-2. É capaz de estimular a linfangiogênese de

forma indireta, recrutando células inflamatórias que expressam o Vegfr-1 e que quando estimuladas produzem Vegf-c e Vegf-d(91), ou de forma direta, ligando-se ao Vegfr-2 expresso nas CELs(92).

Ainda com importante papel na fase inicial da embriogênese linfática, temos o neuropilin 2 e a podoplanina.

Neuropilin 2 é um co-receptor, que nas CELs está internalizado junto ao Vegfr-3 sob a ligação do Vegf-c/-d, tendo provável ação moduladora sobre a via de sinalização do Vegfr-3(93).

A podoplanina é uma glicoproteína expressa predominantemente nas CELs e por esse motivo é usada como marcador de vasos linfáticos, apresentando alta especificidade(94). É reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40(95). Atua nas CELs promovendo a adesão celular, migração e a formação tubular(96). Posteriormente sua expressão fica restrita a pequenos vasos linfáticos destituídos de células musculares lisas(17).

As moléculas com participação numa fase mais tardia da linfangiogênese são: Foxc 2, Ephrin B2, Angiopoetinas 1 e 2 e Integrinas.

O fator de transcrição Foxc 2 não é essencial ao desenvolvimento linfático precoce, porém é necessário num estágio tardio da linfangiogênese, regulando a morfogênese das valvas linfáticas e controlando as interações das CELs com as células musculares lisas vasculares(97).

Ephrin B2, ligante do receptor Eph B4, tem papel de destaque na

remodelação e maturação do plexo vascular linfático, estimulando brotamentos que darão origem à rede de capilares linfáticos e promovendo a maturação dos vasos coletores, caracterizada pela deposição de membrana basal, recrutamento de células musculares lisas vasculares e desenvolvimento de valvas nesses vasos. Este processo prolonga-se até o período pós-natal, terminando com a organização hierarquizada da rede de vasos linfáticos(98).

As Angiopoetinas 1 e 2 (Ang 1 e 2), ligam-se aos receptores Tie 1 e 2. Esses estão expressos em CELs e são essenciais na remodelação, maturação e estabilização dos vasos sanguíneos e linfáticos em desenvolvimento(99).

A Integrina beta 1, receptor expresso nas CELs, interage com o colágeno e a fibronectina, podendo induzir a fosforilação do Vegfr-3, algumas vezes mesmo que este último não esteja sendo estimulado pelo seu ligante(100). A Integrina alfa 5 beta 1 participa da ativação do Vegfr-3 pelo Vegf-c, funcionando provavelmente com um modulador dessa via de sinalização(101). A Integrina alfa 9 beta 1 tem provável papel no desenvolvimento e função dos vasos linfáticos(102).

Recentemente foi descoberto que vários fatores de crescimento têm a capacidade de estimular a proliferação, migração e formação tubular nas CELs, de forma similar ao que ocorre com a via de sinalização Vegf-c/-d/Vegfr-3. Essa descoberta mostra a complexidade do processo de linfangiogênese, o qual é regido por inúmeras moléculas com papéis

específicos, mas que muitas vezes também apresentam funções secundárias e atuam por vias alternativas, formando um intrincado sistema de sinalização. Dentre esses fatores destacam-se o fator de crescimento derivado de plaquetas (Pdgf), o fator de crescimento derivado de fibroblastos 2 (Fgf-2), o fator de crescimento hepatocítico (Hgf) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2 (Igf-1 e Igf-2). Acredita-se que essas moléculas promovam a linfangiogênese, principalmente de forma indireta, através do recrutamento de células inflamatórias, células tumorais ou mesenquimais, que quando estimuladas produzem Vegf-c/-d, ou diretamente, através da ligação com seus respectivos receptores (Pdgfr, Fgfr, C-met e Igfr) expressos nas CELs(103-106).

3.3 Metástases linfáticas e linfangiogênese tumoral

O sistema linfático representa uma via fisiológica acessória através da qual o excesso de líquido consegue fluir do espaço intersticial de volta para o sangue(64). Contudo, de forma patológica, também serve de rota de escape primária para células cancerosas atingirem linfonodos regionais (metástases regionais)(107). Como o sistema linfático acaba drenando no sistema sanguíneo, essas células cancerosas podem, por fim, alcançar a corrente sanguínea e daí se disseminar por todo o corpo (metástases à distância ou sistêmicas)(107).

As mortes por câncer raramente são causadas pelo tumor primário, mas sim pela disseminação metastática de células malignas para órgãos distantes(18).

A disseminação de células tumorais pode ocorrer através de várias vias, incluindo infiltração tecidual local, semeadura direta de cavidades corporais e invasão do sistema vascular sanguíneo, porém estudos mostram que para muitos tipos de tumores sólidos em humanos a via inicial mais comum é através do sistema linfático para os linfonodos regionais(108).

Metástase para linfonodo é um importante fator prognóstico usado como marcador de agressividade tumoral, disseminação, estágio avançado e pior prognóstico, além de também ser usado como critério para escolhas terapêuticas(109).

O status linfonodal não permite a predição prognóstica em pacientes que apresentam pequenos tumores, sem envolvimento linfonodal (estágio inicial). Portanto outros marcadores confiáveis para predizer disseminação neoplásica, que não a detecção da própria metástase, podem melhorar a prognosticação da doença ou podem ser úteis em decisões terapêuticas nos casos de câncer precoce(110).

A densidade vascular linfática e a presença de invasão vascular linfática (IVL), frequentemente observada na periferia dos tumores sólidos malignos, têm se mostrado promissores como indicadores prognósticos antes da ocorrência da metástase(110).

Em câncer de mama, por exemplo, a presença de células neoplásicas no interior de vasos linfáticos tem se revelado um fator preditivo de envolvimento linfonodal e um fator prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de doença(111, 112) e, de fato, já foi incluída como fator prognóstico adverso numa série de protocolos de recomendações com respeito à terapêutica sistêmica adjuvante pós-operatória em casos de câncer de mama precoce desenvolvidos pelo International Consensus Panel durante a Conferência de Saint Gallen desde 2005(113).

Um outro exemplo é o câncer gástrico precoce, no qual a incidência de micrometástases linfonodais tem se mostrado maior em pacientes com IVL, indicando uma relação estreita entre a IVL e estágios iniciais da metástase linfonodal(114).

Outros exemplos também são os carcinomas de bexiga(115) e de esôfago(116) com linfonodo negativos, nos quais IVL pode fornecer informações úteis quanto ao prognóstico e quanto às condutas clínicas nos pacientes com cânceres precoces sem envolvimento linfonodal.

Uma correlação do número de vasos linfáticos (densidade vascular), detectada por imuno-histoquímica, com prognóstico desfavorável tem sido observada em câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer cervical, câncer pulmonar de células não pequenas, câncer de bexiga, câncer cólon-retal e câncer gástrico. No entanto, para que a quantidade de vasos linfáticos num tumor sólido seja um marcador confiável

de prognóstico, as técnicas de quantificação têm que se caracterizar por uma baixa variação intra-observador e interobservador(110).

A existência de vasos linfáticos funcionais no interior de cânceres humanos e a habilidade dos tumores estimularem ativamente a linfangiogênese têm gerado algumas controvérsias(18). Vasos linfáticos intratumorais são detectados em alguns cânceres humanos, e em alguns desses casos há relatos de correlação positiva entre a presença de vasos linfáticos intratumorais e metástases linfonodais e mau prognóstico(19, 20). Contudo esses vasos linfáticos intratumorais podem ser pouco funcionais e não necessários para o processo de metastatização linfática(21, 22).

Em vários tumores sólidos humanos se detectou a expressão do fator de crescimento linfangiogênico Vegf-c, produzido por células tumorais, por células estromais e por células inflamatórias associadas ao tumor. Muitos estudos clínico-patológicos relataram uma correlação positiva dessa expressão com invasão vascular linfática, metástases para linfonodo, metástases à distância, e sobrevida menor, mas não necessariamente com a densidade de vasos linfáticos na área tumoral(17, 117, 118).

A expressão de Vegf-c e Vegf-d em tumores tem sido motivo de intensas pesquisas no estudo da progressão do câncer. Constatou-se que a expressão desses fatores de crescimento estimula o endotélio linfático nas proximidades a proliferar, brotar e migrar em direção ao tumor, levando à formação de novos vasos linfáticos na periferia do tumor, e em alguns casos também dentro do tumor(21, 119-125). Esses fatos sugerem que ao invés de

canais meramente passivos para o trânsito de células tumorais, os vasos linfáticos podem ter um papel mais ativo no processo de metástase. O endotélio linfático em proliferação e brotamento poderia facilitar ativamente a disseminação ou até mesmo capturar células tumorais(26, 126). Contudo, alguns estudos sugerem que a linfangiogênese não é indispensável e que vasos linfáticos pré-existent, ativados por fatores de crescimento, seriam suficientes para o evento metastático(22).

Esses fatores de crescimento secretados pelo tumor também estimulam a dilatação dos vasos linfáticos pré-existent na área tumoral, o que leva a um aumento no fluxo de linfa(26, 27). Além disso, podem ainda estimular a linfangiogênese e a hiperplasia sinusoidal nos linfonodos que drenam a região, mesmo antes da entrada das células tumorais no sistema linfático, o que pode ser interpretado como se o tumor estivesse preparando um microambiente adequado para a disseminação posterior das células malignas(28-31).

Todas essas alterações acabam, por fim, aumentando a área de contato entre as células tumorais e a vasculatura linfática, além de aumentar o fluxo de linfa drenado da área tumoral(21, 26, 119-121, 123, 125).

O fato de que a inibição de metástases tumorais através da administração de Vegfr-3 solúvel bloqueia a linfangiogênese tumoral, mas não afeta os vasos linfáticos pré-existent, sugere que a neoformação de vasos linfáticos associados ao tumor ou então a ativação dos vasos linfáticos

já existentes seria necessária para a ocorrência de metástases linfáticas(26, 127-129).

O Vegf-c também pode ativar o endotélio vascular para facilitar a entrada de células tumorais no sistema linfático através da promoção de interações moleculares entre as células tumorais e as CELs. Isso pode ser mediado pela secreção de fatores parácrinos, tais como proteases e agentes quimiotáticos, pelas CELs, o que pode induzir o desprendimento, migração e invasão das células tumorais ou então a alteração das propriedades funcionais do endotélio linfático, facilitando a adesão e internalização das células malignas nos vasos. Alternativamente, o endotélio ativado pelo Vegf-c também poderia produzir fatores que promoveriam a sobrevivência das células neoplásicas dentro do sistema linfático(18).

A quimiocina CCL 21 secretada por CELs, por exemplo, mostrou promover a migração de células metastáticas de melanoma maligno que expressam o receptor CCR 7(130).

Os sinais moleculares que guiam certos tipos de tumor para metastatizarem em órgãos-alvo específicos têm sido elucidados. O endotélio vascular possui características moleculares específicas em cada tecido, o que facilita a adesão de células tumorais e o seu direcionamento para órgãos específicos(109).

Os receptores de quimiocina CCR 7 e CXCR 4 são expressos em grande número de cópias, em pelo menos algumas células do câncer de mama humano, enquanto os seus respectivos ligantes, as quimiocinas CCL

21 e CXCL 12, são produzidos pelo endotélio linfático nos linfonodos, na medula óssea, nos pulmões e no fígado, sendo que esses são os locais mais frequentemente atingidos por metástases nesse tipo de câncer(131).

Apesar de todas essas descobertas os mecanismos de metástase linfática ainda são pouco conhecidos, podendo-se afirmar que não se trata de um evento aleatório, mas sim um processo de múltiplas etapas sequenciais, extremamente complexo, altamente organizado e tecido-específico.

A linfangiogênese tem importante papel na invasão e disseminação de vários tumores, incluindo os carcinomas ovarianos.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Parecer da Comissão de Ética

O projeto do presente estudo (Protocolo de Pesquisa número 1312/09) teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29/01/2010.

4.2 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo, selecionado-se casos de tumores ovarianos mucinosos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo-SP) e do laboratório Consultoria em Patologia (Botucatu-SP).

4.3 Critérios de inclusão

Somente tumores ovarianos com histologia mucinosa “borderline” ou maligna foram incluídos neste estudo.

4.4 Casuística

Foram selecionados 124 casos entre 1996 e 2005 (Universidade de São Paulo) e entre 2004 e 2011 (Consultoria em Patologia). Do laudo anatomopatológico e, quando disponível, do prontuário médico, foram recuperadas as seguintes informações clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas relevantes: idade da paciente, diagnóstico de neoplasia maligna prévia ou concomitante extra-ovariana, lateralidade do tumor, tamanho do tumor e extensão extra-ovariana, incluindo-se presença de pseudomixoma.

Os cortes histológicos originais corados pelo método de hematoxilina & eosina foram revistos por BGLA e CRF, tendo sido feita a marcação das áreas mais representativas dos tumores nos respectivos blocos de parafina, para construção de blocos de microrranjos de tecido. Os tumores foram classificados de acordo com a presença e tipo de invasão estromal (infiltrativo, multinodular e expansivo/confluente) (figuras 1-3), tipo celular (mülleriano, intestinal, pilórico, gastrointestinal, misto mülleriano/intestinal e indeterminado) (figuras 4-7), grau histológico de acordo com o Sistema de Silverberg(132) (figuras 8-10), extensão da necrose (focal, inferior a 50% e superior a 50%), envolvimento vascular peritumoral, extensão do tumor para outros tecidos/órgãos, e envolvimento do apêndice cecal. Casos duvidosos foram analisados ao microscópio de dupla cabeça com uma terceira patologista (FMC). Todos os dados foram inseridos em planilha eletrônica (Excell Microsoft Office 2007) e os casos foram agrupados como tumores

primários (grupo 1) e tumores secundários (grupo 2). Foram considerados primários os tumores “borderline” sem pseudomixoma associado e sem história de neoplasia mucinosa prévia ou concomitante extra-ovariana, além dos adenocarcinomas sem suspeita clínica e/ou cirúrgica de outras neoplasias. Entre os tumores secundários foram incluídos tumores “borderline” associados a pseudomixoma peritoneal e os adenocarcinomas com um carcinoma mucinoso primário conhecido em outro local com a morfologia semelhante ao do tumor do ovário.

Figura 1 – Invasão estromal do tipo infiltrativa

Figura 2 – Invasão estromal do tipo multinodular

Figura 3 – Invasão estromal do tipo expansivo/confluyente

Figura 4 – Tipo celular mülleriano

Figura 5 – Tipo celular intestinal

Figura 6 – Tipo celular pilórico

Figura 7 – Tipo celular indeterminado

Figura 8 – Adenocarcinoma grau histológico 1

Figura 9 – Adenocarcinoma grau histológico 2

Figura 10 – Adenocarcinoma grau histológico 3

4.5 Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA)

O procedimento foi realizado na Consultoria em Patologia, Botucatu-SP sob orientação do Prof. Carlos E. Bacchi (diretor da Consultoria em Patologia) e da Prof. Filomena M. Carvalho (Departamento de Patologia da FMUSP). Foi retirado um cilindro de 2,0 mm da área selecionada do tumor, em cada bloco de parafina, designado bloco doador. Estes cilindros foram enxertados em um bloco de parafina receptor com um intervalo de 1,0 mm entre cada cilindro, formando um sistema grade com referências coordenadas nos eixos x e y. Foi utilizado um instrumento de precisão para

construção de TMA do fabricante Beecher Instruments, Silver Spring, MD. Depois que os cilindros foram todos inseridos no bloco receptor, este foi aquecido por 10 minutos na temperatura de 60°C. Foram obtidos cinco blocos. A seguir foram cortadas fitas de 5 µm dos blocos em micrótomo convencional para confecção dos preparados histológicos, utilizando lâminas apropriadas da marca Starfrost slides®, com técnica padronizada. Os primeiros cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina. A seguir foram realizados os cortes histológicos para realização das reações imuno-histoquímicas.

4.6 Técnica de imunoistoquímica

Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo 3-amipropiltrietoxisilano e encubados a temperatura de 60°C durante o período noturno.

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, o primeiro a 60°C, por 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente, por 20 minutos.

A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis.

Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos.

Após a lavagem em água corrente e dois banhos de água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação antigênica mais adequados para os anticorpos citoqueratina 7 (CK7), citoqueratina 20 (CK20), CA125, CDX-2, CA19.9, MUC2, MUC5AC e D2-40 (anti-podoplanina), mostrado na tabela 1 juntamente com a origem e a diluição dos anticorpos.

Os anticorpos foram detectados usando-se Novolink[®] (Leica, Bannockburn, IL, EUA).

As lâminas foram montadas com lamínula e resina para microscopia, sendo examinadas em microscópio de luz.

Para todos os marcadores, exceto D2-40, qualquer porcentagem de células neoplásicas inequivocamente positivas foi considerado como resultado positivo, embora todos os casos positivos tenham mostrado mais de 10% das células coradas.

Tabela 1 – Reagentes e métodos usados para as análises imuno-histoquímicas

Antígeno	Clone/origem	Diluição	Método de recuperação antigênica
CK7	OV-TL 12/30 MOUSE IgG1/DAKO	1/1000	PT LINK 20 minutos, pH baixo
CK20	KS20.8 Ks20.8 MOUSE IgG2a/ZETA	1/800	PT LINK 20 minutos, pH baixo
CA125	OC 125 MOUSE IgG1/ ZYMED	1/800	PT LINK 20 minutos, pH baixo
CDX-2	DAK-CDX-2 MOUSE IgG1/DAKO	1/800	PT LINK 20 minutos, pH alto
CA19.9	SPM110 MOUSE IgG1/ NEOMARKERS	1/1600	PT LINK 20 minutos, pH baixo
MUC2	Ccp 58 MOUSE IgG1 /NOVOCASTRA	1/100	PT LINK 20 minutos, pH alto
MUC5A	CLH2 MOUSE IgG1/NOVOCASTRA	1/200	PT LINK 20 minutos, pH alto
Podoplanina	D2-40 MOUSE IgG1/DAKO	1/200	PT LINK 20 minutos, pH baixo

4.7 Técnica morfométrica para contagem dos vasos

A microdensidade vascular foi avaliada através da quantificação de vasos marcados pela podoplanina. Os preparados foram examinados em microscópio óptico (Nikon, Eclipse 200), selecionando-se as áreas

intratumorais mais vascularizadas no menor aumento (40x). A contagem de microvasos foi realizada em dez campos de grande aumento (400x). A identificação dos vasos linfáticos foi estabelecida com base na presença de células positivas para podoplanina com morfologia consistentes com estrutura de vaso (Figura 1). A DVL de cada caso foi expressa pelo valor médio (número total de vasos em 10 campos microscópicos de grande aumento dividido por 10). A mediana do conjunto de valores da DVL média de todos os casos serviu como ponto de corte para dividir os tumores em de alta ou baixa DVL, tal como sugerido por Hall et al(133).

Figura 11 – Vaso linfático marcado por D2-40 na imuno-histoquímica

4.8 Análise estatística

O teste t foi usado para se comparar a idade entre os 2 grupos (primários e secundários), após a confirmação da distribuição normal pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov.

O teste do Chi-quadrado foi usado para avaliar a associação das variáveis categóricas nos dois grupos.

O razão de chance (“Odds ratio”) com intervalo de confiança de 95% foi calculada para cada uma dessas variáveis.

A DVL foi analisada tanto como variável dicotômica (alta/baixa), quanto como variável contínua.

A DVL contínua foi comparada entre os tumores primários e secundários usando-se o teste de Mann-Whitney U.

A relação entre DVL contínua e tamanho do tumor foi testada usando-se a Correlação de Posto de Spearman.

As variáveis que se mostraram significativas nas análises univariadas foram submetidas a análise multivariada através da regressão logística binária pelo método de *stepwise*.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando MedCalc para Windows (versão 11.5.0.0; MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica), e o valor de *p* foi considerado significativo quando menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Um total de 124 casos preencheram os critérios de inclusão e tiveram os blocos de parafina disponibilizados para este estudo (apêndice). A distribuição dos casos de acordo com o diagnóstico e o sítio primário é mostrada na tabela 2. A idade desta coorte variou de 16 a 81 anos ($50,2 \pm 15,8$ anos). As pacientes com tumores primários mostraram-se mais jovens do que aquelas com tumores secundários, com médias de 46,3 anos e 54,0 anos respectivamente ($p=0,007$).

Tabela 2 – Distribuição dos 124 tumores mucinosos incluídos neste estudo

Diagnóstico	Sítio primário	N (%)
“Borderline” sem pseudomixoma peritoneal	ovário	30 (24,19%)
“Borderline” associado com pseudomixoma peritoneal	apêndice cecal	8 (6,45%)
Adenocarcinoma ovariano primário	ovário	33 (26,61%)
Carcinoma ovariano metastático	cólon-retos	38 (30,64%)
Carcinoma ovariano metastático	apêndice cecal	5 (4,03%)
Carcinoma ovariano metastático	estômago	3 (2,41%)
Carcinoma ovariano metastático	pâncreas/vias biliares	3 (2,41%)
Carcinoma ovariano metastático	mama	2 (1,61%)
Carcinoma ovariano metastático	desconhecido	2 (1,61%)

N = frequência; % = porcento

A distribuição dos casos de acordo com o padrão de invasão estromal, tipo celular, lateralidade do tumor, tamanho do tumor e presença de extensão extra-ovariana é ilustrado na tabela 3.

Tabela 3 – Principais características dos 124 tumores ovarianos selecionados

		N (%)
Padrão de invasão estromal	infiltrativo	46 (53,48)
	multinodular	11 (12,79)
	expansivo (confluente)	29 (33,72)
Tipo celular	intestinal	67 (54,03)
	pilórico	10 (8,06)
	mülleriano	7 (5,64)
	gastrointestinal	19 (15,32)
	misto mülleriano/intestinal	7 (5,64)
	indeterminado	14 (11,29)
Lateralidade	unilateral	95 (76,61)
	bilateral	26 (20,96)
	desconhecido	3 (2,41)
Tamanho do tumor	10,0 cm ou menor	18 (14,51)
	maior que 10,0 cm	69 (55,64)
	desconhecido	37 (29,83)
Extensão extra-ovariana	não	80 (64,51)
	sim	44 (35,48)

N = frequência; % = por cento

As características patológico-cirúrgicas comparativas entre os grupos 1 e 2 são mostradas na tabela 4. Tumores menores e bilaterais, com extensa necrose tumoral e achado cirúrgico de extensão extra-ovariana foram associados com maior probabilidade de envolvimento ovariano secundário.

Tabela 4 – Comparação das características patológico-cirúrgicas entre tumores primários e secundários

		Primários (n=63)	Secundários (n=61)	OR (IC 95%)	p
Tamanho	>10cm	48	21	-	-
	≤10cm	5	13	5,9 (1,9-18,8)	0,002
Bilateralidade	sim	6	20	5 (1,8-13,6)	0,001
	não	57	38	-	-
Doença extra- ovariana	sim	8	36	9,9 (4-24,3)	<0,0001
	não	55	25	-	-
Necrose	<50%	32	43	-	-
	>50%	1	12	8,9 (1,1-72,2)	0,04

n = frequência; OR = "Odds ratio"; IC = intervalo de confiança; % = por cento; p= probabilidade de erro alfa

Os valores de DVL variaram de 0 a 10,1 ($1,6 \pm 2,0$). Não houve correlação entre o tamanho do tumor e a DVL ($\rho=0,88$, $p=0,89$) ou entre a idade e a DVL ($\rho=-0,04$). A DVL foi menor nos tumores secundários, sendo a mediana dos valores igual a 0,4 contra 1,5 nos tumores primários ($p=0,02$). O estudo imuno-histoquímico comparativo entre tumores primários e secundários é mostrado na tabela 5. Os tumores secundários foram mais fortemente relacionados à expressão de CK20, CDX-2 e MUC2. Também mostraram associação negativa importante com a expressão de CK7, CA125 e MUC5AC, e alta DVL. Em decorrência do desprendimento de parte do corte histológico durante o processamento técnico das reações imuno-histoquímicas, houve a perda de uma amostra para as reações CK7, CK20,

CDX-2 e MUC5AC. Em relação às reações CA125, CA19.9 e MUC2, foram perdidas duas amostras em cada marcador. A DVL não foi contabilizada em uma amostra devido à mesma limitação técnica.

Tabela 5 – Características imuno-histoquímicas dos 124 tumores selecionados

		Primário (n=63)	Metastático (n=61)	OR (IC 95%)	<i>p</i>
CK7	positivo	58	18	0,04 (0,01-0,1)	<0,0001
	negativo	5	42	-	-
CK20	positivo	37	52	4,6 (1,8-11,2)	0,0009
	negativo	26	8	-	-
CDX-2	positivo	45	57	7,6 (2,1-27,4)	0,002
	negativo	18	3	-	-
CA125	positivo	38	7	0,08 (0,03-0,2)	<0,0001
	negativo	24	53	-	-
CA19.9	positivo	49	37	0,4 (0,2-0,9)	0,04
	negativo	13	23	-	-
MUC2	positivo	34	56	11,5 (3,7-35,7)	<0,0001
	negativo	28	4	-	-
MUC5AC	positivo	50	25	0,2 (0,08-0,4)	<0,0001
	negativo	13	35	-	-
DVL	alta	36	23	0,4 (0,2-0,9)	0,02
	baixa	26	38	-	-

n = frequência; OR = "Odds ratio"; IC = intervalo de confiança; % = por cento; *p* = probabilidade de erro alfa

Ao compararmos DVL alta e baixa com as características de diferenciação primário *versus* metastático, classicamente descritas na literatura, encontramos associação estatisticamente significativa somente com as seguintes variáveis: ausência de expressão de CK7, positividade para CA125 e expressão de MUC5AC (tabela 6).

Nós construímos inicialmente um modelo de regressão logística, incluindo idade da paciente, tamanho do tumor e lateralidade como preditores de natureza metastática. A idade foi excluída do modelo. Em seguida, testamos um modelo com o tamanho do tumor, lateralidade e todos os marcadores imuno-histoquímicos (CK7, CK20, CDX-2, CA125, CA19.9, MUC2 e MUC5AC). As variáveis que permaneceram no modelo foram o tamanho do tumor, lateralidade, expressão de CK7 e de MUC2. Finalmente, foi testada a DVL com as variáveis acima em um novo modelo. A DVL foi excluída do modelo depois de não se mostrar tão significativa quando comparada com o tamanho do tumor, lateralidade, expressão de CK7 e de MUC2. O modelo final identificado como melhor preditor de depósito secundário ficou assim estabelecido: tumor medindo 10,0 cm ou menos (OR 9,4; IC 95% 1,2-69,2), bilateralidade (OR 51,5; IC 95% 7,1-370,2) e ausência de expressão de CK7 (OR 64,8; IC 95% 9,4-447). A probabilidade de um tumor ser secundário neste modelo é reduzida se MUC2 não for expresso (OR 0,1; IC 95% 0,01-0,6). O nosso modelo previu com precisão 86,2% das metástases.

Tabela 6 – Comparação entre a densidade vascular linfática intratumoral e os outros indicadores utilizados na discriminação do sítio primário

		DVL alta (%) (n=59)	DVL baixa (%) (n=64)	p
Idade	Mediana (anos)	46	51	0,89 ^a
Tamanho	≤10 cm	10(56)	8(44)	0,89 ^b
	>10 cm	42(61)	27(39)	
	ignorado	7	29	
Bilateralidade	sim	15(60)	10(40)	0,23 ^b
	não	42(44)	53(56)	
	ignorado	2	1	
Necrose	>50%	4(31)	9(69)	0,75 ^b
	<50%	30(40)	45(60)	
	NA	25	10	
CK7	negativo	16 (34)	31 (66)	0,03 ^b
	positivo	42 (56)	33 (44)	
	NA	1	0	
CK20	positivo	42(47)	47(53)	0,94 ^b
	negativo	16(48)	17(52)	
	NA	1	0	
CDX-2	positivo	48(47)	54(53)	0,99 ^b
	negativo	10(50)	10(50)	
	NA	1	0	
CA125	positivo	27 (61)	17 (39)	0,04 ^b
	negativo	31 (40)	46 (60)	
	NA	1	1	
CA19.9	positivo	45(52)	41(48)	0,18 ^b
	negativo	13(37)	22(63)	
	NA	1	1	

Cont.

Continuação tabela 6

MUC2	positivo	41 (46)	49 (54)	0,50 ^b
	negativo	17 (55)	14 (45)	
	NA	1	1	
MUC5AC	positivo	46 (62)	28 (38)	0,0001 ^b
	negativo	12 (25)	36 (75)	
	NA	1	0	

DVL = densidade vascular linfática, % = por cento; n = frequência; p = probabilidade de erro alfa;
a = teste de Mann-Whitney U; b = teste do chi-quadrado

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As características por nós encontradas que melhor predizem natureza metastática foram as clássicas já estabelecidas pela literatura. Em patologia cirúrgica de rotina mais de 80% dos casos podem ser classificados de forma confiável utilizando-se esses indicadores (tumor medindo 10,0 cm ou menos, bilateralidade e falta de expressão de CK7). Um simples algoritmo baseado no tamanho do tumor e lateralidade foi previamente determinado e classifica corretamente 84-90% dos casos (12, 134), corroborando os nossos achados. Os casos problemáticos não são tão comuns e a utilização dos critérios estabelecidos, que é a soma de dados clínicos, características macroscópicas, histologia e imuno-histoquímica, melhora substancialmente a precisão do processo.

De acordo com os nossos resultados, a quantificação da linfangiogênese através da DVL no momento do diagnóstico do tumor não parece estar diretamente relacionada com o processo metastático nos ovários. Entretanto, temos a limitação de que os processos que envolvem formação de vasos e todo o microambiente tumoral é dinâmico. Levando-se em consideração que os tumores metastáticos têm pior prognóstico que os primários, a falta de evidências de um papel para a linfangiogênese na metástase ovariana é corroborada pelo fato da DVL não ter se mostrado um bom marcador prognóstico em estudos prévios, como o de Sundar et al. com 108 tumores de ovário(34). Outros mecanismos que não a proliferação de

vasos linfáticos podem estar envolvidos na disseminação metastática(26, 27), como por exemplo a ativação por fatores de crescimento de vasos linfáticos pré-existentes. O fator de crescimento linfangiogênico Vegf-c está expresso em células tumorais e do microambiente tumoral em vários tumores sólidos, apresentando correlação positiva dessa expressão com invasão linfática, metástases e sobrevida menor. No entanto, outros autores mostraram que essa expressão de Vegf-c não necessariamente está relacionada com aumento da DVL na área tumoral(17, 117, 118), reforçando a ideia de que outros mecanismos que não a linfangiogênese estão provavelmente envolvidos no processo metastático nos ovários.

De acordo com o conhecimento atual, é evidente que a disseminação metastática não é um acontecimento aleatório, mas um processo de múltiplos passos sequenciais que é extremamente complexo, altamente organizado e tecido específico. Nos ovários não há provas substanciais mostrando um papel ativo do microambiente na invasão e processo de metástase. Entretanto, a frequente proliferação estromal que acompanha os tumores epiteliais ovarianos, sobretudo os mucinosos, indica que existem fenômenos importantes que ocorrem durante o crescimento neoplásico com ativa participação do estroma. A DVL não se mostrou um bom preditor da natureza metastática talvez porque a linfangiogênese não seja necessária para a disseminação, que ocorre mais frequentemente através da cavidade peritoneal, ou talvez porque todos os tumores epiteliais nos ovários sejam, na realidade, depósitos secundários, seja da tuba, focos de endometriose ou de outros sítios. Evidências recentes foram publicadas defendendo uma

mudança de paradigma no que diz respeito à origem dos cânceres epiteliais ditos primários do ovário. A mudança é apoiada por evidências moleculares, genéticas e histológicas, indicando que os tumores serosos se originam do epitélio tubário. Os tumores de células endometrioides e de células claras são originários provavelmente de tecido endometrial deslocado a partir da cavidade endometrial (menstruação retrógrada). Tumores mucinosos e de epitélio transicional possivelmente se originam de restos embrionários constituídos por ninhos epiteliais de localização para-ovariana e na junção tuboperitoneal. Dessa forma, essa alteração no paradigma reuniria numa mesma categoria todos os tumores epiteliais do ovário, os tumores metastáticos e o grupo considerado atualmente como primário, propondo que todos eles são, na realidade, depósitos secundários, neoplasias originárias de tecidos fora dos ovários(135). Assim, esta poderia ser a explicação para a falta de grandes diferenças na DVL entre os dois grupos.

Os nossos resultados de certa maneira infrutíferos com DVL não excluem a possibilidade de que outras diferenças entre o microambiente dos tumores primários e secundários, envolvendo ou não a vasculatura linfática. O fato do estroma ser um componente relevante nas neoplasias epiteliais ovarianas, ressalta o a importância de se aprofundar os estudos sobre a troca de mensagens moleculares entre as células tumorais e o seu microambiente nos ovários. Apesar dos dois grupos estudados provavelmente pertencerem à mesma categoria de origem, o processo de disseminação metastática é complexo e direcionado a tecidos alvo específicos. Esse processo de disseminação direcionada envolve

mecanismos moleculares, como mostraram Muller et al. em trabalho sobre a relação dos receptores de quimiocina CCR 7 e CXCR 4 com os seus respectivos ligantes, as quimiocinas CCL 21 e CXCL 12, no direcionamento das células de alguns tumores de mama para linfonodos, medula óssea, pulmões e fígado, curiosamente os locais mais frequentemente atingidos por metástases nesse tipo de câncer(131). As moléculas e alterações genéticas envolvidas nesse processo de metástase direcionada, ao apresentarem um padrão específico, como uma assinatura, seriam uma fonte de novos marcadores que poderiam permitir uma classificação mais precisa dos tumores mucinosos nos ovários.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A DVL intratumoral foi maior em tumores primários do que em lesões secundárias, o que sugere possíveis diferenças no microambiente entre as duas condições.

Apesar de na análise univariada a DVL mostrar diferenças significativas entre tumores mucinosos ovarianos primários e secundários, após análise multivariada outras características se mostraram mais fortes na distinção entre os dois grupos.

O modelo final identificado como melhor preditor de doença secundária incluiu tumor medindo 10,0 cm ou menos, bilateralidade, ausência de expressão de CK7 e presença de expressão de MUC2.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [updated 2013; cited]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. INCA. Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2013 [updated 2013; cited]; Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014.
3. Tavassoli F.A. D, editor. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003.
4. Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tubes and broad ligament. Atlas of Tumors Pathology. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1998.
5. Prat J. Ovarian carcinomas, including secondary tumors: diagnostically challenging areas. Mod Pathol. 2005 Feb;18 Suppl 2:S99-111.
6. Young RH. From krukemberg to today: the ever present problems posed by metastatic tumors in the ovary: part I. Historical perspective, general principles, mucinous tumors including the krukemberg tumor. Adv Anat Pathol. 2006 Sep;13(5):205-27.
7. McCluggage WG, Wilkinson N. Metastatic neoplasms involving the ovary: a review with an emphasis on morphological and immunohistochemical features. Histopathology. 2005 Sep;47(3):231-47.
8. Demopoulos RI, Touger L, Dubin N. Secondary ovarian carcinoma: a clinical and pathological evaluation. Int J Gynecol Pathol. 1987;6(2):166-75.
9. Mazur MT, Hsueh S, Gersell DJ. Metastases to the female genital tract. Analysis of 325 cases. Cancer. 1984 May 1;53(9):1978-84.
10. Vang R, Ronnett BM. Distinction of primary ovarian mucinous tumors and mucinous tumors metastatic to the ovary. A practical approach with guidelines for prediction of primary site for metastases of uncertain origen (Review). Pathology Case Reviews. 2006 Jan/Feb;11:18-30.

11. Lee KR, Young RH. The distinction between primary and metastatic mucinous carcinomas of the ovary: gross and histologic findings in 50 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003 Mar;27(3):281-92.
12. Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jul;27(7):985-93.
13. Ji H, Isacson C, Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Cytokeratins 7 and 20, Dpc4, and MUC5AC in the distinction of metastatic mucinous carcinomas in the ovary from primary ovarian mucinous tumors: Dpc4 assists in identifying metastatic pancreatic carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2002 Oct;21(4):391-400.
14. Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol*. 2003 May;16(5):403-10.
15. Wang NP, Zee S, Zarbo R, et al. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. *Appl Immunohistochem*. 1995;3:99-107.
16. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*. 2000 Sep;13(9):962-72.
17. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):573-83.
18. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:367-97.
19. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2002 Mar 1;62(5):1315-20.
20. Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res*. 2003 Apr 15;63(8):1920-6.
21. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1883-6.
22. Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO. Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9789-98.

23. Zaganelli FL, Carvalho FM, Almeida BG, Bacchi CE, Goes JC, Calil MA, et al. Intratumoral lymphatic vessel density and clinicopathologic features of patients with early-stage cervical cancer after radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Oct;20(7):1225-31.
24. Kawamura L, Carvalho FM, Alves BG, Bacchi CE, Goes JC, Calil MA, et al. Association between intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) and clinicopathologic features in endometrial cancer: a retrospective cohort study. *World J Surg Oncol*. 2010;8:89.
25. Goes RS, Carvalho JP, Almeida BG, Bacchi CE, Goes JC, Calil MA, et al. Intratumoral lymphatic vessel density in vulvar squamous cell carcinomas: a possible association with favorable prognosis. *Int J Gynecol Pathol*. 2012 Jan;31(1):8-14.
26. He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4739-46.
27. Hoshida T, Isaka N, Hagendoorn J, di Tomaso E, Chen YL, Pytowski B, et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):8065-75.
28. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):774-86.
29. Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, Bruch M, Kort EJ, Ditlev J, et al. Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10365-76.
30. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1089-99.
31. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1010-7.
32. Kitano H, Kageyama S, Hewitt SM, Hayashi R, Doki Y, Ozaki Y, et al. Podoplanin expression in cancerous stroma induces lymphangiogenesis and predicts lymphatic spread and patient survival. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Oct;134(10):1520-7.

33. Zhang Y, Tang H, Cai J, Zhang T, Guo J, Feng D, et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett.* 2011 Apr 1;303(1):47-55.
34. Sundar SS, Zhang H, Brown P, Manek S, Han C, Kaur K, et al. Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2006 Jun 5;94(11):1650-7.
35. Fadare O, Orejudos MP, Jain R, Mariappan MR, Hecht JL, Renshaw IL, et al. A comparative analysis of lymphatic vessel density in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors) with and without lymph node involvement. *Int J Gynecol Pathol.* 2008 Oct;27(4):483-90.
36. Seidman JD, Russell P, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract.* 5th ed. New York: Springer-Verlag; 2001. p. 843-4.
37. Hart WR, Norris HJ. Borderline and malignant mucinous tumors of the ovary. Histologic criteria and clinical behavior. *Cancer.* 1973 May;31(5):1031-45.
38. Classification and staging of malignant tumours in the female pelvis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1971;50(1):1-7.
39. Serov SF, Scully RE, Sobin LH. Histologic typing of ovarian tumors. *International histological classification and staging of tumors.* Geneva: World Health Organization; 1973.
40. Ronnett BM, Kurman RJ, Zahn CM, Shmookler BM, Jablonski KA, Kass ME, et al. Pseudomyxoma peritonei in women: a clinicopathologic analysis of 30 cases with emphasis on site of origin, prognosis, and relationship to ovarian mucinous tumors of low malignant potential. *Hum Pathol.* 1995 May;26(5):509-24.
41. Prayson RA, Hart WR, Petras RE. Pseudomyxoma peritonei. A clinicopathologic study of 19 cases with emphasis on site of origin and nature of associated ovarian tumors. *Am J Surg Pathol.* 1994 Jun;18(6):591-603.
42. Young RH, Gilks CB, Scully RE. Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonei. A clinicopathological analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix. *Am J Surg Pathol.* 1991 May;15(5):415-29.
43. Ronnett BM, Kurman RJ, Shmookler BM, Sugarbaker PH, Young RH. The morphologic spectrum of ovarian metastases of appendiceal adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of tumors often misinterpreted as primary ovarian tumors or metastatic tumors from other gastrointestinal sites. *Am J Surg Pathol.* 1997 Oct;21(10):1144-55.

44. Ronnett BM, Shmookler BM, Diener-West M, Sugarbaker PH, Kurman RJ. Immunohistochemical evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women. *Int J Gynecol Pathol*. 1997 Jan;16(1):1-9.
45. Young RH, Scully RE. Differential diagnosis of ovarian tumors based primarily on their patterns and cell types. *Semin Diagn Pathol*. 2001 Aug;18(3):161-235.
46. Daya D, Nazerali L, Frank GL. Metastatic ovarian carcinoma of large intestinal origin simulating primary ovarian carcinoma. A clinicopathologic study of 25 cases. *Am J Clin Pathol*. 1992 Jun;97(6):751-8.
47. Lash RH, Hart WR. Intestinal adenocarcinomas metastatic to the ovaries. A clinicopathologic evaluation of 22 cases. *Am J Surg Pathol*. 1987 Feb;11(2):114-21.
48. Riopel MA, Ronnett BM, Kurman RJ. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors: atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive, and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 1999 Jun;23(6):617-35.
49. Young RH, Hart WR. Metastases from carcinomas of the pancreas simulating primary mucinous tumors of the ovary. A report of seven cases. *Am J Surg Pathol*. 1989 Sep;13(9):748-56.
50. Young RH, Scully RE. Ovarian metastases from carcinoma of the gallbladder and extrahepatic bile ducts simulating primary tumors of the ovary. A report of six cases. *Int J Gynecol Pathol*. 1990;9(1):60-72.
51. Rodriguez IM, Prat J. Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002 Feb;26(2):139-52.
52. Ulbright TM, Roth LM, Stehman FB. Secondary ovarian neoplasia. A clinicopathologic study of 35 cases. *Cancer*. 1984 Mar 1;53(5):1164-74.
53. Wheelock MC, Putong P. Ovarian metastases from adenocarcinomas of colon and rectum. *Obstet Gynecol*. 1959 Sep;14:291-5.
54. Zhang PJ, Shah M, Spiegel GW, Brooks JJ. Cytokeratin 7 immunoreactivity in rectal adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003 Dec;11(4):306-10.
55. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003 Mar;27(3):303-10.
56. Groisman GM, Meir A, Sabo E. The value of cdx2 immunostaining in differentiating primary ovarian carcinomas from colonic carcinomas metastatic to the ovaries. *Int J Gynecol Pathol*. 2003;23:52-7.

57. Tornillo L, Moch H, Diener PA, Lugli A, Singer G. CDX-2 immunostaining in primary and secondary ovarian carcinomas. *J Clin Pathol*. 2004 Jun;57(6):641-3.
58. Chou YY, Jeng YM, Kao HL, Chen T, Mao TL, Lin MC. Differentiation of ovarian mucinous carcinoma and metastatic colorectal adenocarcinoma by immunostaining with beta-catenin. *Histopathology*. 2003 Aug;43(2):151-6.
59. Zhou M, Chinnaiyan AM, Kleer CG, Lucas PC, Rubin MA. Alpha-Methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol*. 2002 Jul;26(7):926-31.
60. Albarracin CT, Jafri J, Montag AG, Hart J, Kuan SF. Differential expression of MUC2 and MUC5AC mucin genes in primary ovarian and metastatic colonic carcinoma. *Hum Pathol*. 2000 Jun;31(6):672-7.
61. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol*. 2004 Jul;122(1):61-9.
62. O'Connell JT, Tomlinson JS, Roberts AA, McGonigle KF, Barsky SH. Pseudomyxoma peritonei is a disease of MUC2-expressing goblet cells. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):551-64.
63. Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical characterization of signet-ring cell carcinomas of the stomach, breast, and colon. *Am J Clin Pathol*. 2004 Jun;121(6):884-92.
64. Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol*. 2005 Aug;15(8):434-41.
65. Rusznyak I, Foldi M, Szabo G. Lymphatics and Lymph Circulation. In: Youlton L, editor. *Physiology and Pathology*. Oxford; 1967.
66. Sauter B, Foedinger D, Sterniczky B, Wolff K, Rappersberger K. Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells. Differential expression of CD31, CD34, and type IV collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma, and hemangioma in situ. *J Histochem Cytochem*. 1998 Feb;46(2):165-76.
67. Stoitzner P, Pfaller K, Stossel H, Romani N. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol*. 2002 Jan;118(1):117-25.
68. Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech*. 2001 Oct 15;55(2):92-9.
69. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jan;4(1):35-45.

70. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004 Jan;5(1):74-80.
71. Huntington GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat (*Felis domestica*). *Anat Rec.* 1908;2:1-19.
72. Ny A, Koch M, Schneider M, Neven E, Tong RT, Maity S, et al. A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med.* 2005 Sep;11(9):998-1004.
73. Wilting J, Aref Y, Huang R, Tomarev SI, Schweigerer L, Christ B, et al. Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol.* 2006 Apr 1;292(1):165-73.
74. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, Regele H, Bojarski-Nagy K, Bartel G, et al. Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):230-4.
75. Maruyama K, Li M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2363-72.
76. Gale NW, Prevo R, Espinosa J, Ferguson DJ, Dominguez MG, Yancopoulos GD, et al. Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol Cell Biol.* 2007 Jan;27(2):595-604.
77. Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS.* 2004 Jul-Aug;112(7-8):526-38.
78. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell.* 1999 Sep 17;98(6):769-78.
79. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7):1505-13.
80. Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002 Nov;225(3):351-7.
81. Petrova TV, Makinen T, Makela TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, et al. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.* 2002 Sep 2;21(17):4593-9.
82. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science.* 1998 Oct 30;282(5390):946-9.

83. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3566-70.
84. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):199-205.
85. Karpanen T, Wirzenius M, Makinen T, Veikkola T, Haisma HJ, Achen MG, et al. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *Am J Pathol*. 2006 Aug;169(2):708-18.
86. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 1997 May 30;276(5317):1423-5.
87. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J*. 2001 Mar 15;20(6):1223-31.
88. Oliver G, Alitalo K. The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:457-83.
89. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar;25(6):2441-9.
90. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
91. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(7):1040-50.
92. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, et al. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *FASEB J*. 2004 Jul;18(10):1111-3.
93. Karpanen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, et al. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J*. 2006 Jul;20(9):1462-72.
94. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):385-94.

95. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005 Mar;166(3):913-21.
96. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003 Jul 15;22(14):3546-56.
97. Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, et al. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):974-81.
98. Makinen T, Adams RH, Bailey J, Lu Q, Ziemiecki A, Alitalo K, et al. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev*. 2005 Feb 1;19(3):397-410.
99. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell*. 2002 Sep;3(3):411-23.
100. Wang JF, Zhang XF, Groopman JE. Stimulation of beta 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J Biol Chem*. 2001 Nov 9;276(45):41950-7.
101. Zhang X, Groopman JE, Wang JF. Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 and integrin alpha5beta1. *J Cell Physiol*. 2005 Jan;202(1):205-14.
102. Huang XZ, Wu JF, Ferrando R, Lee JH, Wang YL, Farese RV, Jr., et al. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(14):5208-15.
103. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, et al. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*. 2004 Oct;6(4):333-45.
104. Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, Fannon M, Chen EJ, Butterfield C, et al. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11658-63.
105. Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J*. 2005 Aug 17;24(16):2885-95.
106. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, et al. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15593-8.

107. Zwaans BM, Bielenberg DR. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Res.* 2007 Sep-Nov;74(2-3):145-58.
108. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 2002 Jul;16(9):922-34.
109. Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphangiogenesis in cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 20;25(27):4298-307.
110. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer.* 2006 Dec 18;95(12):1611-25.
111. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):306-12.
112. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 2006 Feb;42(3):357-62.
113. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005 Oct;16(10):1569-83.
114. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Arima H, Mataka Y, Ehi K, et al. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer.* 2005 Sep 19;93(6):688-93.
115. Lotan Y, Gupta A, Shariat SF, Palapattu GS, Vazina A, Karakiewicz PI, et al. Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 20;23(27):6533-9.
116. Vazquez-Sequeiros E, Wang L, Burgart L, Harmsen W, Zinsmeister A, Allen M, et al. Occult lymph node metastases as a predictor of tumor relapse in patients with node-negative esophageal carcinoma. *Gastroenterology.* 2002 Jun;122(7):1815-21.
117. Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* 2003 Oct;314(1):167-77.
118. He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 4;1654(1):3-12.

119. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):192-8.
120. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):186-91.
121. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J*. 2001 Feb 15;20(4):672-82.
122. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):1786-90.
123. Yanai Y, Furuhashi T, Kimura Y, Yamaguchi K, Yasoshima T, Mitaka T, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes human gastric carcinoma lymph node metastasis in mice. *J Exp Clin Cancer Res*. 2001 Sep;20(3):419-28.
124. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer*. 2002 Apr 20;98(6):946-51.
125. Kawakami M, Yanai Y, Hata F, Hirata K. Vascular endothelial growth factor C promotes lymph node metastasis in a rectal cancer orthotopic model. *Surg Today*. 2005;35(2):131-8.
126. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):946-53.
127. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jun 5;94(11):819-25.
128. Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res*. 2003 Feb 1;63(3):713-22.
129. Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, et al. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6901-9.

130. Shields JD, Emmett MS, Dunn DB, Joory KD, Sage LM, Rigby H, et al. Chemokine-mediated migration of melanoma cells towards lymphatics--a mechanism contributing to metastasis. *Oncogene*. 2007 May 10;26(21):2997-3005.
131. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):50-6.
132. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol*. 2000 Jan;19(1):7-15.
133. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Jul;129(7):716-9.
134. Yemelyanova AV, Vang R, Judson K, Wu LS, Ronnett BM. Distinction of primary and metastatic mucinous tumors involving the ovary: analysis of size and laterality data by primary site with reevaluation of an algorithm for tumor classification. *Am J Surg Pathol*. 2008 Jan;32(1):128-38.
135. Kurman RJ, Shih Ie M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*. 2011 Jul;42(7):918-31.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/01/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1312/09**, intitulado: "**LINFANGIOGÊNESE E SEU PAPEL NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE TUMORES MUCINOSOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS DO OVÁRIO**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Filomena Marino Carvalho**

Pesquisador (a) Executante: **Bernardo Gomes de Lacerda Almeida**

CAPPesq, 29 de Janeiro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

APÊNDICE 2 - Relação das amostras dos TMA

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraováriana	Pseudotumoxoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de Invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
1	adenoca.	ovário	não	não	16	indeterm.	infiltrativo	não	2	A	26	unilateral	-	-	+	+	-	-	-	0,8
2	bordeline	ovário	não	não	18	GI	NA	NA	NA	NA	33	bilateral	+	-	-	=	-	-	+	IGN
3	bordeline	ovário	não	não	18	GI	NA	NA	NA	NA	33	bilateral	+	+	-	+	+	-	+	0
4	bordeline	ovário	não	não	19	intestinal	NA	NA	NA	NA	10	unilateral	+	-	+	-	+	+	+	3,5
5	adenoca.	ovário	não	não	20	intestinal	confluente	não	2	A	26	unilateral	+	+	+	+	-	+	+	3,3
6	adenoca.	ovário	não	não	24	GI/müller.	confluente	não	1	A	17,5	unilateral	+	+	+	+	+	-	+	4,3
7	bordeline	ovário	não	não	25	intestinal	NA	NA	NA	NA	28	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	2,2
8	bordeline	ovário	não	não	26	mülleriano	NA	NA	NA	NA	21	unilateral	+	+	-	-	+	-	+	4
9	bordeline	ovário	não	não	27	GI	NA	NA	NA	NA	7	unilateral	+	-	-	-	+	-	+	3,3
10	bordeline	ovário	não	não	28	GI	NA	NA	NA	NA	15	unilateral	-	-	-	+	+	-	+	2,8
11	bordeline	ovário	não	não	29	GI	NA	NA	NA	NA	18	unilateral	+	-	-	-	+	+	+	0,3
12	adenoca.	ovário	não	não	30	pilórico	infiltrativo	não	2	A	IGN	unilateral	+	+	-	-	+	-	+	0
13	krukenberg	apêndice	sim	não	31	indeterm.	infiltrativo	não	3	A	16,5	bilateral	+	+	+	-	+	+	-	1,6
14	adenoca.	ovário	não	não	32	pilórico	infiltrativo	não	2	<50%	15	unilateral	+	+	+	-	+	-	-	2,7
15	adenoca.	cólon-retos	sim	não	32	intestinal	multinod.	não	3	>50%	21	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0
16	adenoca.	cólon-retos	não	não	33	intestinal	infiltrativo	não	2	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	0
17	adenoca..	cólon-retos	não	não	33	intestinal	Multinod.	não	3	>50%	5	bilateral	-	+	+	-	+	+	-	0,5
18	bordeline	ovário	não	não	33	pilórico	NA	NA	NA	NA	20	unilateral	+	+	-	-	+	-	+	2,1

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinod. = multinodular; GI/müller. = GI/mülleriano; indeterm. = indeterminado; IGN = ignorado; GI = gastrointestinal; NA = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = percento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; n° = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraováriana	Pseudomixoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
19	adenoc.	ovário	não	não	35	intestinal	infiltrativo	não	2	A	IGN	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	8,1
20	bordeline	ovário	não	não	35	GI/müller.	NA	NA	NA	NA	8	bilateral	+	-	-	-	+	-	+	5,1
21	bordeline	ovário	não	não	35	GI/müller.	NA	NA	NA	NA	30	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	1,9
22	adenoc.	ovário	não	não	36	intestinal	infiltrativo	não	2	< 50%	IGN	unilateral	+	-	+	-	-	+	+	0
23	bordeline	ovário	não	não	36	GI/müller.	NA	NA	NA	NA	13	unilateral	+	-	+	+	+	+	+	5,3
24	adenoc.	cólon-retos	sim	não	37	intestinal	infiltrativo	não	2	< 50%	3,5	unilateral	IGN	IGN	IGN	IGN	IGN	IGN	IGN	4,1
25	krukenberg	estômago	não	não	37	indeterm.	infiltrativo	não	3	A	13	bilateral	+	+	+	-	-	-	+	0,2
26	adenoc.	ovário	sim	não	37	intestinal	infiltrativo	IGN	1	A	18	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	1,6
27	adenoc.	ovário	não	não	38	mülleriano	confluente	não	2	A	IGN	unilateral	+	-	+	-	+	-	+	0,3
28	adenoc.	ovário	não	não	38	GI	infiltrativo	não	2	> 50%	26	unilateral	+	-	-	IGN	IGN	IGN	-	0
29	bordeline	ovário	não	não	38	GI	NA	NA	NA	NA	27	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	4,3
30	adenoc.	cólon-retos	sim	não	39	intestinal	infiltrativo	não	1	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0,3
31	adenoc.	ovário	não	não	39	mülleriano	confluente	não	1	A	15	unilateral	-	-	+	+	+	-	-	0,3
32	bordeline	ovário	não	não	39	GI	NA	NA	NA	NA	15	unilateral	+	+	+	+	+	+	-	2,4
33	adenoc.	ovário	não	não	40	intestinal	infiltrativo	não	1	< 50%	22	unilateral	+	+	+	-	-	+	-	0
34	adenoc.	cólon-retos	não	não	40	intestinal	multinod.	não	3	< 50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
35	adenoc.	cólon-retos	sim	não	40	intestinal	confluente	não	1	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0,2
36	adenoc.	ovário	não	não	41	intestinal	confluente	não	1	< 50%	16	unilateral	+	+	+	-	+	+	+	1,9
37	adenoca.	ovário	sim	não	41	mülleriano	infiltrativo	IGN	3	< 50%	19	unilateral	+	-	-	+	+	+	+	1,3
38	adenoca.	desc.	não	não	41	indeterm.	multinod.	IGN	3	A	11	bilateral	-	-	+	-	-	-	+	6,2

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinod. = multinodular; GI/müller. = GI/mülleriano; indeterm. = indeterminado; IGN = ignorado; IGN = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = porcento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; nº = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraováriana	Pseudomixoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
39	adenoca.	ovário	não	não	42	intestinal	confluente	não	2	A	IGN	unilateral	+	-	-	+	+	+	+	0
40	adenoca.	cólon-retos	sim	não	42	intestinal	infiltrativo	não	2	A	IGN	IGN	-	+	+	-	-	+	-	0
41	bordeline	ovário	não	não	42	GI	NA	NA	NA	NA	20	unilateral	+	+	-	-	+	-	+	2,6
42	adenoca.	ovário	não	não	43	GI/müller.	confluente	não	2	A	IGN	unilateral	+	-	+	+	+	+	+	3,9
43	adenoca.	cólon-retos	não	não	43	intestinal	infiltrativo	não	2	>50%	7	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	4,7
44	adenoca.	cólon-retos	sim	não	43	intestinal	infiltrativo	sim	2	<50%	9	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	0,7
45	adenoca.	desc.	não	não	43	indeterm.	multinod.	IGN	3	<50%	15	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	10,1
46	adenoca.	cólon-retos	sim	não	44	intestinal	infiltrativo	não	2	<50%	IGN	IGN	-	+	+	-	-	+	-	1,8
47	adenoca.	cólon-retos	sim	não	44	intestinal	confluente	não	2	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0
48	bordeline	ovário	não	não	45	plóico	NA	NA	NA	NA	28	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	0,4
49	adenoca.	cólon-retos	sim	não	45	intestinal	infiltrativo	IGN	1	<50%	12	bilateral	-	+	+	-	+	+	-	0,4
50	adenoca.	cólon-retos	sim	não	46	indeterm.	infiltrativo	não	2	A	IGN	bilateral	-	+	+	-	+	+	-	9,3
51	adenoca.	cólon-retos	sim	não	46	intestinal	multinod.	não	3	>50%	11	unilateral	-	+	+	-	+	-	-	4,4
52	krukenberg	estômago	não	não	46	indeterm.	infiltrativo	não	3	A	4,5	bilateral	+	-	+	-	+	+	+	2,8
53	adenoca.	cólon-retos	não	não	46	intestinal	infiltrativo	não	2	>50%	7	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0,9
54	adenoca.	cólon-retos	sim	não	47	intestinal	infiltrativo	não	2	<50%	IGN	unilateral	+	+	+	-	+	+	-	0,3
55	adenoca.	apêndice	sim	não	47	GI	infiltrativo	não	2	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	+	0
56	adenoca.	cólon-retos	sim	não	47	intestinal	infiltrativo	não	2	>50%	2	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0
57	bordeline	ovário	não	não	48	GI	NA	NA	NA	NA	22	unilateral	+	-	+	-	-	-	+	2,1
58	adenoca.	ovário	não	não	49	GI/müller.	confluente	não	1	A	23	unilateral	+	-	+	+	-	-	+	0
59	adenoca.	pâncreas/vb	sim	não	50	intestinal	confluente	não	2	A	16	bilateral	+	+	+	-	+	+	-	0

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinod. = multinodular; GI/müller. = GI/mülleriano; indeterm. = indeterminado; IGN = ignorado; IGN = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = porcento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; n° = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraovariana	Pseudomixoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
60	adenoca.	cólon-retos	sim	não	50	intestinal	infiltrativo	não	3	<50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0
61	adenoca.	cólon-retos	não	não	51	intestinal	multinod.	não	2	>50%	13,5	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
62	adenoca.	cólon-retos	não	não	51	intestinal	infiltrativo	sim	3	>50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
63	adenoca.	cólon-retos	não	não	51	intestinal	multinod.	não	3	>50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
64	adenoca.	ovário	não	não	52	plúrico	infiltrativo	não	1	A	12	unilateral	+	+	+	+	+	-	+	0
65	adenoca.	ovário	sim	não	52	intestinal	confluente	não	1	A	IGN	unilateral	+	-	+	-	+	-	+	0
66	adenoca.	apêndice	sim	não	52	intestinal	confluente	não	1	A	25	bilateral	+	+	+	-	+	+	+	0,6
67	adenoca.	ovário	não	não	52	indeterm.	infiltrativo	não	2	<50%	11,5	unilateral	+	+	+	-	+	+	-	0
68	krukenberg	mama	sim	não	53	indeterm.	infiltrativo	não	3	<50%	13	bilateral	+	-	-	+	+	+	-	0,5
69	adenoca.	mama	sim	não	53	indeterm.	infiltrativo	não	1	A	3	unilateral	+	-	-	-	-	+	-	0
70	adenoca.	cólon-retos	não	não	53	intestinal	multinod.	não	3	>50%	10,5	bilateral	-	+	+	-	+	+	-	1,1
71	adenoca.	cólon-retos	sim	não	53	intestinal	infiltrativo	IGN	1	<50%	9	unilateral	-	+	+	+	-	+	-	0,4
72	adenoca.	ovário	não	não	54	GI	confluente	IGN	2	A	21	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	1,7
73	adenoca.	ovário	não	não	55	plúrico	confluente	não	1	A	23	unilateral	+	+	+	+	+	-	+	1,1
74	adenoca.	cólon-retos	sim	não	56	intestinal	infiltrativo	não	2	A	16	unilateral	-	-	+	-	-	+	+	0,7
75	adenoca.	cólon-retos	não	não	56	intestinal	multinod.	não	2	>50%	13,8	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0,1
76	bordeline	ovário	sim	não	56	intestinal	NA	NA	NA	NA	21	unilateral	+	+	+	-	+	+	+	0,3
77	bordeline	apêndice	sim	sim	56	intestinal	NA	NA	NA	NA	10	bilateral	+	-	+	-	+	+	+	0
78	bordeline	ovário	não	não	57	intestinal	NA	NA	NA	NA	26	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	2,8
79	adenoca.	cólon-retos	sim	não	58	intestinal	confluente	não	2	<50%	15	bilateral	-	+	+	-	-	+	-	1,4
80	bordeline	ovário	sim	não	58	intestinal	NA	NA	NA	NA	16	bilateral	-	+	+	-	+	+	+	4,5

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinod. = multinodular; GI/müller. = GI/mülleriano ; indeterm. = indeterminado; IGN = ignorado; GI = gastrointestinal; NA = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = porcento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; n° = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraovariana	Pseudomixoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
81	adenoca.	apêndice	sim	não	59	intestinal	infiltrativo	não	1	A	11,5	bilateral	+	-	-	+	-	-	+	1,1
82	adenoca.	cólon-retos	não	não	60	intestinal	confluente	não	1	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	+	0
83	bordeline	ovário	não	não	60	plúrico	NA	NA	NA	NA	17	unilateral	+	+	+	-	-	-	+	0
84	adenoca.	ovário	não	não	60	GI/müller.	infiltrativo	IGN	2	< 50%	8	unilateral	+	-	+	-	+	+	+	1,3
85	adenoca.	ovário	não	não	61	indeterm.	confluente	não	2	A	3	unilateral	+	-	-	+	+	-	-	0,6
86	bordeline	ovário	não	não	61	mülleriano	NA	NA	NA	NA	22	unilateral	+	-	+	+	+	-	-	0,8
87	adenoca.	cólon-retos	não	não	63	intestinal	confluente	não	1	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	+	0
88	adenoca.	cólon-retos	sim	não	63	intestinal	confluente	não	1	A	21,5	bilateral	-	+	+	-	+	+	-	0
89	bordeline	ovário	não	não	63	GI	NA	NA	NA	NA	39	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	0,5
90	adenoca.	cólon-retos	não	não	64	intestinal	confluente	não	1	A	IGN	bilateral	-	+	+	-	+	+	-	0
91	adenoca.	ovário	sim	não	64	plúrico	confluente	não	1	A	22	unilateral	+	+	+	-	-	-	+	1,9
92	bordeline	apêndice	sim	sim	64	intestinal	NA	NA	NA	NA	23	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	1,2
93	adenoca.	ovário	não	não	65	intestinal	confluente	não	1	A	20	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	2,3
94	adenoca.	cólon-retos	não	não	65	intestinal	multinod.	não	2	< 50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
95	adenoca.	ovário	não	não	66	mülleriano	confluente	não	2	< 50%	13	unilateral	+	+	+	+	+	-	-	2
96	adenoca.	cólon-retos	não	não	66	intestinal	infiltrativo	não	2	< 50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
97	bordeline	ovário	não	não	66	GI	NA	NA	NA	NA	24	unilateral	+	+	-	+	+	-	+	5,4
98	bordeline	apêndice/pâncreas/vb	sim	sim	67	intestinal	NA	NA	NA	NA	IGN	IGN	+	+	+	-	+	+	+	4,5
99	adenoca.	pâncreas/vb	sim	não	68	GI	infiltrativo	não	2	< 50%	IGN	unilateral	+	+	+	-	+	+	+	0,2
100	adenoca.	pâncreas/vb	sim	não	68	indeterm.	infiltrativo	não	2	A	IGN	unilateral	+	+	+	+	+	+	-	2,9
101	bordeline	ovário	não	não	68	GI	NA	NA	NA	NA	27	bilateral	+	+	+	+	+	+	+	4,6

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinod. = multinodular; GI/müller. = GI/mülleriano ; indeterm. = indeterminado; IGN = ignorado; GI = gastrointestinal; NA = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = porcento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; n° = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraováriana	Pseudomixoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
102	adenoca.	estômago	não	não	69	indeterm.	infiltrativo	sim	3	<50%	18	bilateral	+	-	+	+	+	+	+	1,8
103	bordeline	ovário	não	não	70	pliórico	NA	NA	NA	NA	25	bilateral	+	-	-	+	-	-	+	3,9
104	bordeline	apêndice	sim	sim	71	intestinal	NA	NA	NA	NA	9	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	3,6
105	adenoca.	cólon-retos	não	não	72	intestinal	infiltrativo	não	1	<50%	20	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	4,7
106	bordeline	ovário	não	não	72	intestinal	NA	NA	NA	NA	18	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0,8
107	bordeline	apêndice	sim	sim	73	intestinal	NA	NA	NA	NA	IGN	bilateral	-	+	+	-	-	+	+	0,9
108	bordeline	apêndice	sim	sim	73	intestinal	NA	NA	NA	NA	10	bilateral	+	+	+	+	+	+	+	1,4
109	bordeline	ovário	não	não	74	GI	NA	NA	NA	NA	15	unilateral	+	-	+	+	+	+	+	4,3
110	adenoca.	ovário	não	não	74	intestinal	infiltrativo	IGN	1	<50%	18	unilateral	+	-	+	+	+	+	+	1,2
111	adenoca.	ovário	sim	não	75	GI	confluente	não	1	A	25	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	0
112	adenoca.	apêndice	sim	não	75	intestinal	confluente	não	1	A	IGN	unilateral	+	+	+	-	+	+	+	1,4
113	bordeline	ovário	não	não	75	intestinal	NA	NA	NA	NA	30	unilateral	+	+	+	-	-	+	+	5,3
114	adenoca.	cólon-retos	não	não	77	intestinal	infiltrativo	não	2	<50%	IGN	unilateral	+	+	+	+	+	+	-	0
115	bordeline	apêndice	sim	sim	77	intestinal	NA	NA	NA	NA	7	unilateral	+	+	+	-	+	+	+	0,5
116	adenoca.	cólon-retos	não	não	79	intestinal	infiltrativo	não	2	>50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	+	0
117	bordeline	ovário	não	não	79	GI	NA	NA	NA	NA	21	unilateral	+	+	+	+	-	+	+	1,4
118	bordeline	apêndice	sim	sim	81	intestinal	NA	NA	NA	NA	14	unilateral	-	+	+	-	+	+	+	4
119	adenoca.	cólon-retos	não	não	IGN	intestinal	infiltrativo	não	3	<50%	IGN	unilateral	-	+	+	-	+	+	-	0,5
120	adenoca.	ovário	não	não	IGN	mülleriano	confluente	não	1	A	IGN	unilateral	+	-	-	+	+	-	-	0,3
121	adenoca.	cólon-retos	não	não	IGN	intestinal	confluente	não	2	A	IGN	unilateral	-	+	+	-	-	+	-	0
122	adenoca.	ovário	não	não	IGN	indeterm.	infiltrativo	não	2	<50%	IGN	unilateral	+	-	-	+	+	-	-	0,1

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinode. = multinodular; GI/múler. = GI/múleriano ; indeterm. = indeterminado; IGN = ignorado; GI = gastrointestinal; NA = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = porcento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; n° = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo

Caso	Diagnóstico	Sítio primário	Doença extraováriana	Pseudomixoma	Idade (anos)	Tipo celular	Padrão de invasão	IVL	Grau histológico	Necrose	Tamanho do tumor (cm)	Lateralidade	CK7	CK20	CDX-2	CA125	CA19.9	MUC2	MUC5AC	DVL (nº de vasos/10 CGA)
123	adenoca.	ovário	não	não	IGN	pilórico	infiltrativo	não	1	< 50%	15	unilateral	+	+	+	+	+	+	+	0
124	adenoca.	ovário	não	não	IGN	intestinal	confluentes	não	1	< 50%	IGN	unilateral	+	+	+	-	+	+	+	0

adenoca. = adenocarcinoma; desc. = desconhecido; multinod. = multinodular; GI/müller. = GI/mülleriano ; indetermin. = indeterminado; IGN = ignorado; GI = gastrointestinal; NA = não se aplica; A = ausente; I = indeterminado; < = menor; % = porcento; > = maior; IVL = invasão vascular linfática; cm = centímetro; n° = número; CGA = campos de grande aumento; + = positivo; - = negativo