

ADRIANA YOSHIDA OLÍMPIO

**Expressão da Ciclo-oxigenase-2 e do Ki67 em
tumores benigno, *borderline* e maligno de ovário**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. MAURICETTE DERCHAIN
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LILIANA APARECIDA L. DE ANGELO ANDRADE**

**Unicamp
2006**

ADRIANA YOSHIDA OLÍMPIO

**Expressão da Ciclo-oxigenase-2 e do Ki67 em
tumores benigno, *borderline* e maligno de ovário**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Tocoginecologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. MAURICETTE DERCHAIN
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LILIANA APARECIDA L. DE ANGELO ANDRADE

**Unicamp
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
Unicamp**

OI 4 i	Olímpio, Adriana Yoshida Expressão da Ciclo-oxigenase-2 e do Ki67 em tumores benigno, borderline e maligno de ovário / Adriana Yoshida Olímpio. Campinas, SP: [s.n.], 2006. Orientadores: Sophie Françoise Mauricette Derchain, Liliana Aparecida Lucci de Ângelo Andrade Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Ovários. 2. Ovários - Cancer. 3. Tumor borderline de ovário. I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette. II. Andrade, Liliana Aparecida Lucci de Ângelo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
--------	--

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: ADRIANA YOSHIDA OLÍMPIO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. MAURICETTE DERCHAIN

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. LILIANA APARECIDA L. DE ANGELO ANDRADE

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 07/08/2006

Dedico este trabalho...

*Ao meu marido Hugo,
aos meus pais Massayoshi e Yoko,
ao meu irmão Paulo César e minha irmã Natalie.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sophie Derchain pela excelente orientação, pelo incentivo, ensinamentos e amizade.

À Profa. Dra. Liliana Andrade pelos ensinamentos, pela leitura das lâminas, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Otavio Sarian pelo coleguismo, pela valiosa ajuda em todas as etapas do trabalho, principalmente na análise estatística.

Ao Dr. Francisco Pignataro pela seleção dos blocos e leitura das inúmeras lâminas.

Ao Prof. Dr. José Vassalo pelas contribuições na idealização do projeto e na avaliação do processo de qualificação.

Ao Prof. Dr. Alberto Sagarra pelas contribuições no processo de qualificação.

Ao Prof. Dr. Gustavo Antonio de Souza, pelo suporte da área de Oncologia Ginecológica do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM).

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental, pela ajuda nas reações de imunoistoquímica e por terem proporcionado um ambiente tão agradável de trabalho: Marisa Matsura, Rosemeire Dionisio, Cristiano Chagas, Eduardo Prates e Julio César Moraes.

A todos os funcionários do Setor de Arquivo Médico Estatístico (SAME) pelo levantamento dos prontuários, especialmente: Carlos Barbieri, Carla Vicente e Rogéria Malaquias.

À Margarete Donadon pelo apoio burocrático aos alunos de pós-graduação.

À Neuza Bauducci, Sonia Pianca, Débora Fernandez e Priscylla Rosa pelo contínuo apoio da secretaria de oncologia.

Aos colegas da pós-graduação Carlos Scheler, Cássio Cardoso, Luciana Vivas, Patrícia Patury e Trícia Rocha.

À Maria do Rosário R. Zullo e Cylene Camargo pelo auxílio na formatação e correção desta dissertação.

Estudo parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) FAPESP n° 04/09309-5 CNPq n° 307252/2004-3

O estudo teve a participação dos Departamentos de Tocoginecologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. Publicação.....	26
4. Conclusões	49
5. Referências Bibliográficas.....	50
6. Bibliografia de Normatizações	55
7. Anexos	56
7.1. Anexo 1 – Ficha de coleta de dados para neoplasia ovariana	56
7.2. Anexo 2 – Distribuição das mulheres incluídas no estudo	57
7.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	62

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
°C	Graus Celsius, <i>Celsius degrees</i>
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CNPq	Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-1	Ciclo-oxigenase-1; <i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase-2; <i>Cyclooxygenase-2</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético; <i>Ethylene diamine tetracetic acid</i>
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico; <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ESO	Epitélio de superfície ovariano
Et al.	E outro(s), e outra(s)
HER-2/neu	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano; <i>Human epidermal growth factor receptor</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
H₂O₂	Água oxigenada, <i>Hydrogen peroxide</i>

HE	Hematoxilina eosina
M-E	Mesotélio-epitélio de superfície ovariana
p	P valor; <i>P value</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular; <i>Vascular endothelial growth factor</i>

Resumo

Introdução: A hipótese mais aceita atualmente na carcinogênese ovariana é a da ovulação incessante. O traumatismo causado pela ruptura do folículo ovulatório no epitélio ovariano requer uma reparação imediata, levando a uma reação inflamatória. A Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), enzima envolvida na inflamação e outros processos patológicos, catalisa a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico e parece estar relacionada à carcinogênese de diversas neoplasias, entre elas a de ovário. **Objetivos:** Avaliar se os tumores serosos e mucinosos de ovário expressam a COX-2 de maneira crescente quando se comparam tumores benigno, *borderline* e maligno, e investigar se existe alguma relação entre a expressão da COX-2 e a proliferação celular do tumor avaliada pela expressão do Ki67. **Sujeitos e métodos:** Para este estudo de corte transversal foram selecionados os blocos cirúrgicos das pacientes submetidas à laparotomia por tumor de ovário seroso ou mucinoso, benigno, *borderline* ou maligno entre janeiro de 1997 a dezembro de 2003. O estudo foi realizado nos Departamentos de Anatomia Patológica e de Tocoginecologia, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em São Paulo, Brasil. Foram incluídos neste estudo 113 tumores serosos de ovário (67 benignos, 15 *borderline* e 31 malignos) e 85 tumores mucinosos de ovário (48 benignos,

28 *borderline* e 9 malignos). Todas as lâminas obtidas dos espécimes cirúrgicos foram revisadas por um patologista para confirmar o diagnóstico histológico. As expressões da COX-2 e do Ki67 foram obtidas através de reações de imunoistoquímica nestes cortes de tumores epiteliais ovarianos conservados em parafina. **Resultados:** Houve um aumento da expressão da COX-2 na progressão dos tumores benigno para maligno, tanto no seroso quanto nos mucinoso, mais evidente no mucinoso ($p < 0,001$). Comparando os tipos histológicos, a expressão da COX-2 foi mais acentuada nos tumores benignos serosos do que nos mucinosos ($p < 0,01$), mas esta diferença não foi significativa para os tumores *borderline* ($p = 0,11$) ou malignos ($p = 0,71$). Houve um aumento progressivo na expressão do Ki67 de acordo com o aumento do gradiente histológico para os tumores serosos ($p < 0,01$) e mucinosos ($p < 0,01$), mas esta maior expressão não se correlacionou com a da COX-2 no presente estudo ($p = 0,78$). **Conclusões:** Houve uma maior expressão de COX-2 em tumores de ovário seroso do que no mucinoso. A positividade da COX-2 aumenta com a progressão do gradiente morfológico, do benigno para o maligno em ambos os tipos histológicos, mas foi mais acentuada no tumor mucinoso, sugerindo diferentes vias oncogênicas relacionados aos diferentes tipos histológicos. Como a COX-2, a expressão do Ki67 também mostrou maior positividade do tumor benigno para maligno, mas uma correlação entre a expressão da COX-2 e Ki67 não foi encontrada, sugerindo que a COX-2 pode ser necessária para a carcinogênese, mas esta via não é responsável pela proliferação celular em carcinomas ovarianos.

Summary

Introduction: Incessant ovulation is the most accepted hypothesis for ovarian carcinogenesis. The trauma caused by rupture of the ovulation follicle needs an immediate repair of the wound in the ovarian epithelium, which causes an inflammatory response. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an enzyme involved in the inflammatory process and catalyses the reaction that produces prostaglandins from arachidonic acid and has been implicated in various neoplasias, including ovarian cancer. **Objectives:** To evaluate if there is a progressive enhance in COX-2 expression in serous and mucinous ovarian tumors, comparing benign, borderline and malignant tumors and to investigate whether there is a correlation between COX-2 expression and tumor cell proliferation represented by Ki67 expression. **Materials and methods:** For this cross-sectional study, paraffin blocks were selected from women who were submitted to laparotomy and had diagnosis of benign, borderline and malignant serous and mucinous tumors between January 1997 and December 2003. The study was conducted in the Departments of Pathology and Gynecology, in the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), in São Paulo, Brasil. One hundred and thirteen ovarian serous tumors (67 benign, 15 borderline and 31 malignant) and 85 mucinous

ovarian tumors (48 benign, 28 borderline and 9 malignant) were included. All the slides were reviewed by a pathologist to assure the histological diagnosis and COX-2 and Ki67 expressions were obtained in immunohistochemical reactions in these tumor samples. **Results:** From benign to malignant tumors, there was a progressive positive trend in COX-2 expression, in both serous and mucinous tumors, more evident in mucinous ones ($p<0.001$). Comparing histological types, COX-2 expression was more prominent in serous than in mucinous benign tumors ($p<0.01$), but this difference was not significant in borderline ($p=0.11$) or in the malignant categories ($p=0.71$). There was a progressive Ki 67 positivity in line with the tumor histological gradient for both serous ($P<0.01$) and mucinous lesions ($p<0.01$), but this increasing expression did not correlate with COX-2 expression in the present series ($p=0.78$). *Conclusions:* There was a higher COX-2 expression in serous ovarian tumors than in mucinous ones. COX-2 positivity increases in line to the morphologic gradient, from benign to malignant in both histological types, but it was more prominent in mucinous lesions, pointing to different oncogenic pathways related to different histological types. Like COX-2, Ki67 also showed an increasing positivity from benign to malignant tumors but a correlation between COX-2 and Ki67 expressions was not found, suggesting that COX-2 may be required for carcinogenesis, but this pathway is not responsible for cell proliferation in ovarian cancers.

1. Introdução

Nos países ocidentais, o carcinoma de ovário é a principal causa de morte entre as mulheres que apresentam neoplasias ginecológicas. Estima-se que 20.180 casos novos de câncer de ovário sejam diagnosticados nos Estados Unidos em 2006 e que, neste ano, 15.310 mulheres morrerão da doença (American Cancer Society, 2006). No Brasil, não há dados nacionais sobre a prevalência ou mortalidade do câncer de ovário, segundo Pascalicchio et al. (2000). No ano de 1999 houve uma incidência de câncer em geral entre as mulheres, com 134.400 casos ou taxa bruta de 170,79/100.000, e mortalidade anual de 48.300 mulheres ou taxa bruta de mortalidade de 60,66/100.000, sendo que relacionado à incidência do câncer do ovário no Brasil pode-se apenas tecer algumas ilações. É uma neoplasia de baixa incidência populacional, com valores menores que 1.700 casos (taxa bruta inferior a 2,14). Dentre as lesões malignas dos órgãos genitais femininos ocupa a terceira posição, abaixo de colo do útero (primeira posição, com 20.650 mulheres e taxa bruta de 26,28) e corpo do útero (segunda posição, com 5.450 casos e taxa bruta de 6,89), e o acometimento anual tem permanecido

estável. No Município de São Paulo, de 1978 a 1993, representou 3,2% das neoplasias, referidas ano a ano, para o sexo feminino.

O carcinoma de ovário manifesta-se por sintomas leves e inicialmente pouco específicos, e, como consequência, é freqüentemente diagnosticado em estágios avançados (Drake e Becker, 2002). Em cerca de 70% dos casos a neoplasia é descoberta quando a doença apresenta-se disseminada no abdômen ou com metástases a distância, o que contribui para o prognóstico desfavorável dessas mulheres. Conseqüentemente, apesar dos avanços nos tratamentos cirúrgico e antitumoral, a taxa de cura para esta neoplasia não apresentou melhora nas últimas décadas (Huober et al., 2002).

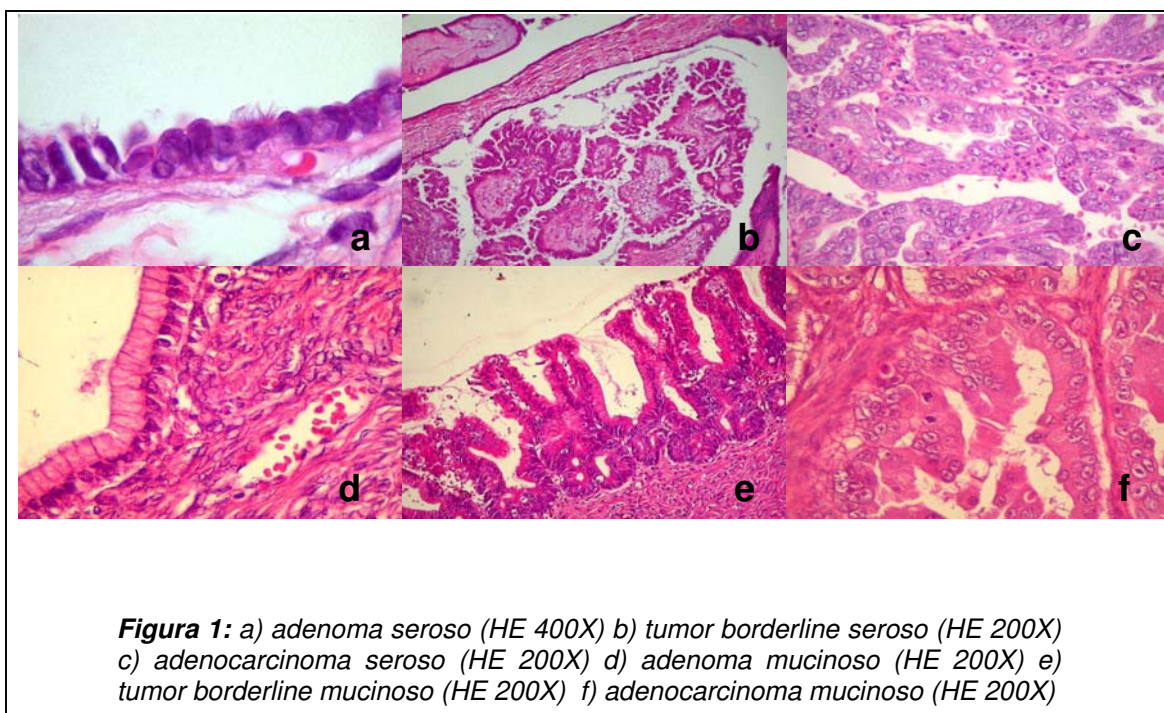
Sabe-se que os carcinomas ovarianos originam-se do epitélio de superfície do ovário. Esta estrutura, derivada do epitélio celômico embrionário, forma os ductos müllerianos, que darão origem ao útero, trompas e terço superior da vagina (Auersperg et al., 2001). Na região gonadal, este epitélio tem a capacidade de se diferenciar em várias estruturas, sendo que essa característica, mantida pelo epitélio de superfície ovariano adulto, permite a diferenciação em epitélios tubário, endometrial e endocervical. As células do epitélio de superfície ovariano estariam ligadas a um estágio precursor, multipotencial e imaturo, o que poderia torná-las susceptíveis à transformação neoplásica (Auersperg et al., 2002). Apenas recentemente os eventos iniciais da progressão para neoplasia a partir do epitélio do ovário estão sendo estudados; entre outros aspectos, a falta de modelos animais para estudo dificultou a pesquisa. Além disso, a cultura do epitélio de superfície ovariano é muito delicada e foi desenvolvida apenas recentemente. No entanto,

já foi demonstrada experimentalmente a capacidade do desenvolvimento do carcinoma ovariano a partir da cultura deste epitélio (Auersperg et al., 2001).

Apesar de muitos esforços dedicados a elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese ovariana, sua patogenia permanece desconhecida e o modelo de progressão, iniciando nos adenomas, progredindo para *borderline* e tumor invasor, não parece se aplicar para todos os carcinomas. Histologicamente os tumores epiteliais de ovário correspondem a um grupo muito heterogêneo e podem ser classificados em seroso, mucinoso, endometrióide, de células claras, de células transicionais ou tumor de Brenner, diferenciação que corresponde ao epitélio dos diferentes órgãos genitais femininos. Segundo Shih e Kurman (2004), podem ser descritos dois principais caminhos de gênese tumoral, classificados em tipo I e tipo II. Esses termos referem-se à patogênese e não ao tipo histológico especificamente. Os tumores do tipo I (carcinoma seroso de baixo grau, carcinoma mucinoso, carcinoma endometrióide, tumor de Brenner maligno e tumor de células claras) se desenvolveriam de maneira progressiva a partir de lesões precursoras bem definidas, denominadas tumores *borderline*, os quais se originam de cistoadenoma ou cistoadenofibroma. Por sua vez, os tumores benignos se desenvolveriam na superfície epitelial do ovário ou em cistos de inclusão, no caso dos tumores serosos e mucinosos, e em cistos endometrióides ou endometriose, no caso dos tumores endometrióides. Esses tumores do tipo I teriam uma evolução mais indolente e um prognóstico mais favorável. Os tumores do tipo II incluem aqueles classificados como carcinomas serosos indiferenciados, tumores mesodermis mistos e carcinomas indiferenciados. Os tumores do tipo II raramente

se associam a lesões morfológicas pré-invasoras reconhecidas, evoluem rapidamente com metástases e apresentam um comportamento muito agressivo.

Os tumores epiteliais mais freqüentemente estudados são o seroso e mucinoso (Figura 1).



Os carcinomas serosos são os mais freqüentes e geralmente se apresentam em estágios avançados ao diagnóstico. Os de tipo I ou de baixo grau são mais raros; surgiriam em uma progressão indolente de cistadenoma para tumor *borderline* e carcinoma. Já os de alto grau, que são bem mais comuns, surgiriam diretamente do epitélio de superfície ovariano, *de novo*, de uma maneira mais

agressiva e em estádios avançados. Estão geralmente associados a mutações do p53 e superexpressão do Ki67 (Kurman et al., 2005, O'Neill et al., 2005).

Os carcinomas mucinosos são pouco freqüentes e representam apenas 3% de todos os carcinomas primários do ovário. Muitos carcinomas mucinosos avançados, anteriormente classificados como primários do ovário, eram na realidade metástases de adenocarcinomas secretores de mucina como de apêndice, colorretal, pâncreas e árvore biliar para o ovário (Seidman et al., 2004). Quando primários do ovário, os tumores mucinosos se apresentam tipicamente nos estágios iniciais ao diagnóstico. Exibem freqüentemente áreas de adenoma e tumor *borderline* em um *continuum* com as áreas de carcinoma coexistindo na mesma neoplasia, compatível com os tumores do tipo I, o que poderia sugerir uma progressão para a malignidade no mesmo modelo que o adenocarcinoma colorretal. No entanto, a comparação com o paradigma adenoma-carcinoma colorretal deve ser vista com cautela, pois no câncer do sistema digestivo as lesões precursoras já estão mais bem estabelecidas (Rodríguez e Prat, 2002; Scott e McCluggage, 2006).

Paralelamente, várias hipóteses vêm sendo estudadas como potenciais fatores envolvidos

citocinas, mediadores de vasodilatação, ocorrendo reparo de DNA e remodelação tecidual, proporcionando um ambiente de estresse oxidativo que poderia progredir para o adenocarcinoma. Também se especula a possibilidade de progressão para adenocarcinoma a partir da hiperplasia do epitélio de superfície ovariano, da transformação neoplásica das células dos cistos de inclusão epitelial e do cisto formado a partir da *rete ovarii*, e ainda de uma célula progenitora ovariana, ilustradas na Figura 2 (Fleming et al. 2006).

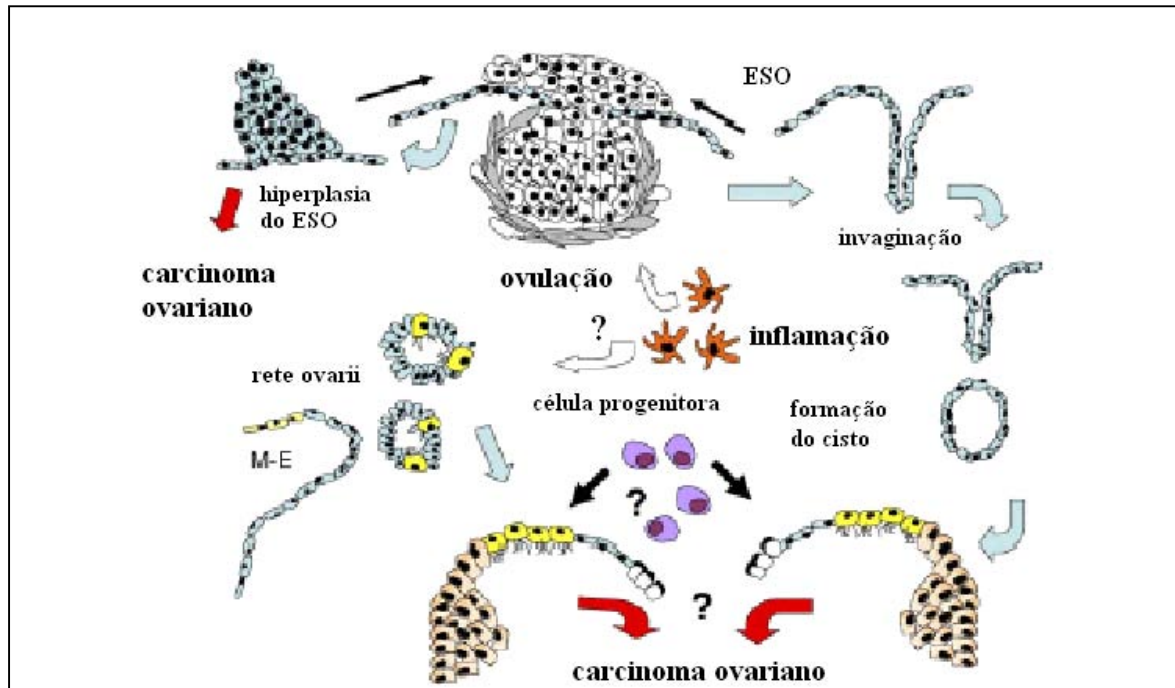


Figura 2: Esquema representativo dos eventos relacionados à ovulação, incluindo estimulação hormonal e inflamação. A reepitelização pós-ovulação envolve a divisão celular das células do epitélio de superfície ovariano (ESO) (células azuis) e sua possível migração para reconstituir a ferida ovulatória. Hiperplasia e transformação do ESO para adenocarcinoma podem ocorrer diretamente a partir dessas células. O hormônio luteinizante sintetizado aumenta a expressão das citocinas e macrófagos e monócitos são recrutados (células laranjas) levando à diferenciação de células foliculares em células luteínicas. A ovulação estimula a formação de invaginações e de cistos de inclusão. As células dos cistos podem se diferenciar e adquirir características mullerianas sob a influência de estímulos hormonais e citocinas, e se tornarem ciliadas (células amarelas) ou secretoras (células brancas). Os túbulos da rete ovarii no hilo do ovário, perto da transição mesotélio-epitélio de superfície ovariano (M-E) também contêm células ciliadas e secretoras e podem se dilatar levando à formação de cistos, pelo menos em roedores. Ainda não se sabe se células em ambos os cistos

podem sofrer transformação neoplásica. Além disso o papel de alguma célula progenitora (célula roxa) na carcinogênese epitelial ainda precisa ser esclarecido. Esquema adaptado de "Flemming et al (2006), incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. Mol Cell Endocrinol., 247(1-2):4-21, 2006". M-E=mesotélio-epitélio de superfície ovariano

As prostaglandinas, por sua vez, são importantes mediadoras em vários processos fisiológicos e patológicos e foram implicadas em várias funções da reprodução como ovulação, fertilização, luteólise, implantação e até mesmo no parto (Hayes e Rock, 2002). As enzimas ciclooxigenases (COX) são catalizadoras da formação da prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. A atividade da COX-1 é constitutiva, presente em quase todas as células do organismo em um nível constante. É responsável, por exemplo, pela produção das prostaglandinas citoprotetoras do estômago, por manter um fluxo sanguíneo adequado no rim insuficiente, pela propriedade de agregação plaquetária. A atividade da COX-2, por sua vez, precisa ser induzida e o nível da proteína eleva-se e decresce após determinados estímulos, como, por exemplo, citocinas e fatores de crescimento. A COX-2 está relacionada a processos patológicos, dentre eles os processos inflamatórios e carcinogênese (Vane et al., 1998). Uma terceira COX foi descoberta em animais: a COX-3 está expressa em grande quantidade no sistema nervoso central de cães e ratos e parece controlar a produção de prostaglandinas reguladoras da dor e febre (Sirois et al., 2004).

Estudos epidemiológicos mostraram que a aspirina e outros antiinflamatórios não-esteroidais (AINE), que são inibidores da COX, podem ser agentes protetores contra o câncer no trato gastrointestinal, mais marcadamente no colorretal (Baron, 2003). Portanto, um enfoque específico tem sido dirigido para estudos que avaliam a relação da COX-2 com a carcinogênese: a enzima tem sido implicada no

desenvolvimento de diversas neoplasias como de pulmão, cabeça e pescoço, colorretal e mama (Mao et al., 2005, Choe et al., 2005, Alrawi et al., 2006, Gallicchio et al., 2006). Em recente estudo realizado no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), foi avaliada por imunistoquímica a expressão de COX-2 em lesões pré-neoplásicas de colo uterino e alguns casos de carcinoma (9 cervicites, 33 NIC I, 28 NIC II, 146 NIC III e 7 carcinomas escamosos). A expressão da COX-2 foi detectada em 118 casos (52,9%), entretanto não houve qualquer relação entre este marcador e a gravidade de lesão cervical (Sarian et al., 2006).

No ovário, os resultados ainda são divergentes, pois uma meta-análise realizada envolvendo dez estudos concluiu que o uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais não está associada à quimioprevenção do adenocarcinoma (Bonovas et al., 2005). Em recente estudo com mais de 500 casos de câncer de ovário observou-se uma diminuição de risco entre usuárias de AINE (Schildkraut et al., 2006).

Apesar de vários destes estudos epidemiológicos terem utilizado AINEs não seletivas da COX - como aspirina - que inibem a COX-1 e a COX-2, apenas a expressão da COX-2 nos tecidos ovarianos parece estar relacionada à carcinogênese. Observa-se uma associação entre a expressão da COX-2 e o grau de diferenciação da neoplasia ovariana, o prognóstico e tempo de sobrevivência das doentes (Li et al., 2005, Raspollini et al., 2005, Raspollini et al., 2006). Também se observa uma associação da COX-2 com alguns marcadores imunistoquímicos que são mais conhecidos quanto aos mecanismos de carcinogênese, uma vez

que a COX-2 parece estar envolvida na redução da apoptose, ou seja, a expressão da COX-2 está associada ao acúmulo de p53 em adenocarcinomas ovarianos (Shigemasa et al., 2003; Seo et al., 2004). A COX-2 também se correlacionou com a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e CD 34, marcadores da neovascularização tumoral, outro mecanismo de desenvolvimento e progressão tumoral que poderia ser utilizado pela COX-2 (Ali-Fehmi et al., 2003, Fujimoto et al., 2006). Outro mecanismo seria através da proliferação celular no tumor, porém não se encontrou correlação da expressão da COX-2 com o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou com o receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER-2/neu) (Ali Fehmi et al., 2003, Ferrandina et al., 2002).

Em um outro enfoque da relação COX-2 com a carcinogênese, sugeriu-se que os tumores *borderline* poderiam ser precursores dos carcinomas ovarianos (Dursun et al., 2005), especialmente os tumores mucinosos (Ferrandina et al., 2004), demonstrados por uma expressão maior de COX-2 nos tumores francamente invasores do que nos tumores *borderline* mucinosos. Apesar de a neoplasia de ovário não ser muito freqüente, é responsável por uma alta taxa de mortalidade. O presente estudo pretende investigar a expressão da COX-2 nos diferentes tipos histológicos, serosos e mucinosos para avaliar o envolvimento da enzima nas vias de carcinogênese nestes tumores e identificar uma possível expressão imunoistoquímica progressiva crescente da COX-2 nos tumores de ovário na seqüência adenoma-carcinoma. Ao se estudar a correlação das expressões da

COX-2 com a do Ki67, pretende-se também investigar se a COX-2 estaria relacionada à carcinogênese ovariana através da proliferação celular.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar se existe diferença na carcinogênese dos tumores serosos e mucinosos de ovário, medida pela expressão da COX-2 e do Ki67.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se existe um aumento progressivo da expressão da COX-2 e do Ki67 em função do gradiente de malignidade.
- Comparar a expressão da COX-2 e Ki67 segundo o subtipo histológico.
- Avaliar se a expressão da COX-2 está relacionada à expressão do Ki67 nestes tumores.

3. Publicação

quiritelMail

Página 1

Assunto: Manuscript received IJGC-2006-00350 (Cell proliferation activity unrelated to COX-2 expression in ovarian tumors)
De: ijgc@mdanderson.org
Data: Dom, Julho 9, 2006 11:08 am
Para: derchain@supernet.com.br
Prioridade: Normal
Opções: Ver cabeçalho completo | Ver Versão para Impressão | Spam | Não é spam:

Dear Dr. Sophie Derchain:

RE: manuscript no. IJGC-2006-00350

Your paper entitled "Cell proliferation activity unrelated to COX-2 expression in ovarian tumors" has been received for publication consideration in the International Journal of Gynecological Cancer.

You can check the status of your paper by logging in to the author centre at <http://ijgc.manuscriptcentral.com/>

Your login details are:
username: derchain@supernet.com.br
password: derchain

I would be grateful if you could mention the manuscript number in any correspondence. If, in the future, there are any changes to your contact details, please update your Manuscript Central user account. You should also inform the Managing Editor, if the details on the title-page of your manuscript become out-of-date.

John Kavanagh, M.D.

Cell proliferation activity unrelated to COX-2 expression in ovarian tumors

Adriana Yoshida ¹

Luis Otavio Sarian ¹

Liliana A. L. A. Andrade ²

Francisco Pignataro ²

Glauce A. Pinto ¹

Sophie F. M. Derchain ¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

2. Department of Pathology, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Sophie F. M. Derchain, MD, PhD

Rua Antônio Hossri, 629 – Cidade Universitária

13083-370 – Campinas – SP, Brazil.

Phone: +55-19-37889305 / Fax: + 55-19-32895935

E-mail: derchain@supernet.com.br

Abstract:

Objective: To assess the expression of COX-2 and cell proliferation activity (Ki67 expression) in benign, borderline and malignant serous and mucinous ovarian tumors. *Methods:* Expression of COX-2 and Ki67 proteins were evaluated by immunohistochemistry, in paraffin-embedded sections of ovarian epithelial tumors. The study included 113 serous (67 benign, 15 borderline, 31 malignant) and 85 mucinous (48 benign, 28 borderline, 9 malignant) tumors, removed from women who underwent laparotomy between January 1997 and December 2003. *Results:* From benign to malignant tumors, there was a progressive positive trend in COX-2 expression in both serous and mucinous tumors, more evident in mucinous ones ($p<0.001$). Comparing histological types, COX-2 expression was more prominent in serous than in mucinous benign tumors ($p<0.01$), but this difference was not significant in the borderline ($p=0.11$) or malignant categories ($p=0.71$). There was a progressive Ki67 positivity in line with the tumor histological gradient for both serous ($P<0.01$) and mucinous lesions ($p<0.01$), but this increasing expression did not correlate with COX-2 expression in the present series ($p=0.78$). *Conclusion:* There was a higher COX-2 expression in serous ovarian adenomas than in mucinous ones. COX-2 positivity increases in line with the morphologic gradient, from benign to malignant in both histological types, but it was more prominent in mucinous lesions, pointing to different oncogenic pathways related to different histological types. A correlation between the expression of COX-2 and Ki67 was not found, suggesting that COX-2 may be required for carcinogenesis, but this pathway is not responsible for cell proliferation in ovarian tumors.

Key words: Cyclooxygenase; cell proliferation; ovarian cancer; borderline ovarian tumors; immunohistochemistry

Introduction

Second cause of death among gynecologic cancers worldwide, ovarian cancer reached 204,200 new cases and led to 124,700 deaths in 2002 ⁽¹⁾. Most ovarian neoplasms are epithelial in origin, comprising different morphological types, classified into serous, mucinous, endometrioid, clear cell and Brenner tumors ⁽²⁾. Each histological type is further subdivided into three groups, benign, borderline (or of low malignant potential) and malignant according to their morphological features, assumed to have a clinical correspondence ⁽³⁾. However, differently from the well-established knowledge concerning breast, colorectal or cervical cancer precursor lesions, in the ovary it is not completely understood whether benign and borderline tumors progress to invasive lesions. Epidemiologic, pathologic and genetic studies have been developed in order to provide a better understanding of the different pathways involved in the ovarian epithelial tumorigenesis, with preventive and therapeutic options, capable of improving prognosis, being highly desired ⁽⁴⁾.

Various hypotheses have been proposed to explain the ovarian carcinogenesis, and the most widely accepted is the incessant ovulation theory and the inflammatory process. Incessant ovulation causes repeated trauma to the epithelial surface of the ovary, and the inflammatory process caused by ovulation can provide an environment of oxidative stress leading to mutagenic events ⁽⁴⁾. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are the rate-limiting enzymes in the conversion of arachidonic acid to prostanoids. COX-1 seems to be linked to homeostatic processes and is expressed constitutively in almost all cells, while COX-2 is inducible by a variety of *stimuli* and is involved in inflammatory reactions and pathological processes ⁽⁵⁾. COX-2 has been shown to be involved in the tumorigenesis of various cancers: lung, head and neck, colon and breast

(6, 7, 8, 9). Theoretically, a lower expression of COX-2 may be related to the development of borderline ovarian tumors, whereas a higher expression of this enzyme is most prominently found in ovarian carcinomas ⁽¹⁰⁾. Moreover, COX-2 is expressed in some specific histological types of ovarian carcinomas. High levels of this enzyme have been detected in serous, endometrial and undifferentiated carcinomas but not in clear-cell carcinomas ⁽¹¹⁾. Because recent studies suggest that over-expression of COX-2 is related to carcinogenesis by increasing the proliferative activity, promoting neoangiogenesis and reducing apoptosis in human tumors ^(12, 13), the potential use of COX-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer is being regarded with certain optimism ⁽¹⁴⁾.

In association to the inflammatory process, the cell proliferation rate has a well-known association with prognosis in ovarian carcinoma ⁽¹⁵⁾. Used in routine evaluation of neoplasms, detection of nuclear Ki67 antibodies is an excellent estimator of cell proliferation rate, being that advanced ovarian serous carcinomas appears to present a higher expression of Ki67 than other histological types ⁽¹⁶⁾.

Previous reports on the expression of COX-2 in ovarian neoplasms called for further insight into the subject. Information on the expression of COX-2 in epithelial ovarian tumors is still incomplete, although it has been assumed that potential clinical uses of this knowledge might be derived from ongoing research. This study is an attempt to evaluate the expression of the enzyme in epithelial neoplasms, ranging from benign to malignant serous and mucinous tumors. The carcinogenic pathway secondary to inflammation, represented by COX-2 expression, is assessed in parallel to Ki67 expression, a marker of cell proliferation.

Materials and methods

Selection of the patients: surgical specimens of epithelial ovarian neoplasms were identified from women who underwent laparotomy at the Division of Gynecologic Oncology, Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas, between January 1997 and December 2003. The local Ethics Committee approved the study protocol. Patients were excluded if: 1) received chemotherapy or radiotherapy treatments before the surgery, 2) were pregnant at the moment of the diagnosis or 3) had other sincronic or assincronic malignant tumors. After histopathological revision, 198 paraffin blocks were obtained, including 113 serous ovarian tumors (67 benign, 15 borderline and 31 malignant) and 85 mucinous ovarian tumors (48 benign, 28 borderline and 9 malignant).

Patients mean age varied significantly in relation to tumor invasiveness, ranging from mean age of 40.8 (SD 16.3) among women with borderline mucinous tumors to 59.3 years (SD 13.6) in those with serous invasive tumors ($p=0.01$). Women with serous tumors were slightly older than those with mucinous neoplasia ($p=0.04$). Most patients with borderline (96%) and malignant (55%) mucinous tumors were diagnosed at FIGO Stage 1⁽¹⁷⁾, whereas the majority (68%) of women with malignant serous tumors were diagnosed with advanced disease. Tumor grade ranged from low (12%) to high (26%) in serous malignant lesions, but only low- (66%) and moderate-grade (33%) malignant lesions were found in women with mucinous tumors (Table 1).

Immunohistochemistry (IHC)

Tissue specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin in accordance to standard procedures. Two sections (4µm thick) from each tumor block were obtained for the reactions. The slides were deparaffinised in xylene, rehydrated in alcohol, treated with 10% H₂O₂ (3 times for 3 minutes) to block endogenous peroxidase activity and submitted to heat induced epitope retrieval in a steam cooker for 30 minutes using citrate buffer for COX-2 and Tris-EDTA buffer for Ki 67. The sections were incubated with COX-2 mouse monoclonal antibody (clone 4H12), 1:100 (Novocastra, Newcastle, NE, United Kingdom), and Ki 67 monoclonal mouse anti-human antigen (clone MIB-1), 1:150 (Dako, Glostrup, Denmark) and kept overnight at 4° C. Envision (COX-2) and Envision Plus (MIB-1) (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 minutes at 37° C were used. Reaction was revealed using 3'3' diaminobenzidine and slides were counter-stained with Mayer's hematoxylin. Positive and negative controls were carried out for each reaction assay. Different tissue samples were used as control of reactions: ulcerative colitis for COX-2 and lung carcinoma for Ki67. Analysis of all slides in light microscope was performed by the investigators blinded to the patient's clinical parameters. Digitalized photographs were taken from the hot spots areas of reaction with a Nikon COOLPIX Camera 995, and then the images were evaluated with the aid of software for histological analyses (Imagelab 2000).

COX-2 protein expression: COX-2 immunoreactivity grading was based on the German Immunoreactive score ⁽¹⁸⁾. The enzyme expression was analyzed firstly on a subjective evaluation of the intensity of cytoplasmatic staining, and scored from 0 to 3: 0=negative, 1=weak, 2=moderate and 3=strong. This evaluation was performed by two pathologists and, in case of disagreement, the slide was submitted to a revision in a co-

observer microscope and a consent diagnosis was rendered. The value of weighted $\kappa = 0.81$ points towards a very good level of agreement between these two professionals. Subsequently, positive and negative cells were counted, with no less than 500 cells as the minimum acceptable count number in five high power fields (400X). The percentage of positive cells was scored as: no staining as 0; 1 to 10% as 1; 11 to 50% as 2; 51 to 80% as 3 and 81% to 100% as 4. The final score was calculated by multiplying the score obtained with the staining intensity by that derived from the percentage of positive cells, achieving results ranging 0 to 12. This score was deliberately named *COX-2 intensity*. Lesions were then grouped according to the COX-2 intensity, being 1-4 called weak, 5-8 moderate and 9 to 12 strong immunoreactivity. For statistical purposes, two groups were formed: 1) negative and weak immunoreactivity, classified as negative and 2) moderate and strong immunoreactivity, classified as positive.

Ki67 nuclear expression: Lesions were allotted to two distinct groups on the basis of their Ki67 nuclear expression: 1) those with totally negative expression of the marker and 2) those with varying percentages of cells expressing Ki67. The percentage of stained nuclei was used for the assessment of cell proliferation in patients from group 2, with a mandatory minimum count of 500 nuclei in five fields.

Statistical Analysis: The Kruskal-Wallis test was used to analyze the age distribution as related to the malignancy gradient (benign, borderline or malignant). Chi-squares, adapted for trends, were used to assess the proportions of cases with moderate/strong expression of COX-2 and positive for Ki67, in mucinous and serous lesions separately, according to the malignancy gradient. Subsequently, chi-squares were calculated in order to evaluate the null hypothesis of having a similar expression of COX-2 and Ki67 in benign, borderline and malignant lesions, with regards to their mucinous/serous status. A linear

regression model was fit to test for possible differences in percentage of cells expressing Ki67 in benign, borderline and malignant lesions. Finally, a scatter plot of percentage of cells expressing Ki67 against intensity of COX-2 expression, with regression lines depicted in it, was produced. The statistical analysis was performed using R Environment ⁽¹⁹⁾ statistical software package, with significance levels at 5% (two-tail).

Results

In parallelism with the adenoma-carcinoma sequence, there was a progressive trend in COX-2 expression, in both serous ($p=0.015$) and mucinous ($p<0.001$) lesions. This trend is noticeable even before statistical treatment, with 8%, 46% and 89% of, respectively, benign, borderline and malignant mucinous tumors expressing COX-2 in a moderate/strong fashion. For serous tumors, the enhancement in COX-2 expression was less marked, with 60%, 73% and 84% of benign, borderline and malignant lesions, respectively, with moderate/strong COX-2 expression. Comparing serous to mucinous tumors, grouped by their pathological behavior, serous benign tumors expressed COX-2 more prominently than their mucinous counterparts ($p<0.01$; statistic not displayed in table). The same was not true for borderline serous tumors compared to borderline mucinous tumors ($p=0.11$; statistic not displayed in table), nor to the malignant type ($p=0.71$; statistic not displayed in table). Percentage of lesions expressing Ki67 also augmented in line with the adenoma-carcinoma sequence, considering either serous ($P<0.01$) and mucinous lesions ($p<0.01$). In tumors expressing Ki67, percentage of stained cells was higher (34.6%; range 2.6% to 65%) in malignant serous tumors as compared to borderline (11.6%; range 1.8% to 23.7%) and benign (8.3%; range 1.0% to 20.5%) serous tumors ($p<0.01$; statistic not shown in table). Conversely, in the mucinous

type, mean percentage of cells expressing Ki67 was similar in benign, borderline and malignant mucinous tumors (Table 2).

COX-2 intensity did not correlate with Ki67 expression in the present series. Figure 1 portrays the distribution of cases in relation to these two markers, grouped according to the histological type (mucinous, serous) and malignancy gradient of the tumors (benign, borderline and malignant). The scattered plots reflect the lack of relation between COX-2 and Ki67 expression, assumption firmly reinforced by the linear regression model ($p=0.78$).

Discussion

The present series contributes to the knowledge in the field by presenting data on almost two hundred cases of ovarian epithelial tumors, with representative amounts of the various pathological entities commonly found in ovarian neoplasms. The most striking feature of the present series thus resides on its ability to statistically test for eventual dissimilarities in COX-2 expression across histological epithelial ovarian tumor types (serous, mucinous) in their benign, borderline and malignant variants.

As the most obvious finding of this study, a positive trend in COX-2 expression was detected among either serous or mucinous tumors accompanying the adenoma-carcinoma sequence. Serous adenomas presented a higher expression of COX-2 as compared to mucinous adenomas, whereas borderline and malignant lesions did not reproduce this behaviour. The present report is in incomplete alignment with a previous study, which described 26 adenomas, 51 borderline tumors and 37 invasive lesions. The authors of that report found a higher COX-2 expression in serous adenomas and borderline tumors compared to benign and borderline mucinous tumors, but mucinous

and serous carcinomas expressed the marker equally ⁽²⁰⁾. In another study limited to 64 carcinomas, it was found a higher expression of COX-2 in serous and endometrioid carcinomas compared to mucinous cancers ⁽²¹⁾. Of note, in that report, the results are offset by the mixture of serous and mucinous types, which is highly questionable.

The fact that COX-2 expression increases in line to the adenoma-carcinoma sequence in either serous or mucinous tumors allows for the suggestion that both types may share some tumorigenic processes. It has long been demonstrated that COX-2 is inducible by tumor promoters and may ultimately induce epidermal growth factor (EGFR), hence favoring cell proliferation ^(22, 23). Based upon these demonstrations, and considering the morphological and molecular analysis developed by Shih and Kurman ⁽³⁾ (who proposed a tumor progression model for ovarian carcinoma classified in two different categories, designated as types I and II), it is possible to invest in some inferential explanations for the present findings. The designations, types I and II, refer to a dualistic pathway of ovarian tumorigenesis and are not specific histopathological terms. Type I includes low-grade serous, mucinous, endometrioid and clear cell carcinomas as well as Brenner tumors. In this way, low-grade serous carcinomas may follow an adenoma to carcinoma sequence. Most mucinous carcinomas show a gradient pattern with benign, borderline and malignant changes coexisting at the same neoplasia. This fact reinforces the theory of a continuum disease ⁽²⁴⁾. Mucinous tumors are more often diagnosed at an early stage and therefore present better prognosis and survival ⁽²⁵⁾. Conversely, type II tumors consist of moderately or poorly differentiated serous carcinomas, malignant mesodermal tumors and undifferentiated carcinomas. In this way, high-grade serous carcinomas are believed to develop *de novo* directly from the ovarian surface epithelium or the epithelium of cortical inclusion cysts ^(2, 26).

The present sample is not biased towards a specific tumor type because patients with epithelial cancers were consecutively included. Therefore, it was not unexpected that high-grade tumors were found only in patients with serous lesions. This feature of the sample is ostensibly explained by the indolent behavior of mucinous tumors, with clinicians more apt at diagnosing the disease at an earlier stage as compared to what happens with serous tumors. Therefore, it is sensible to infer that most of the serous studied lesions may fall in the Type II category of tumorigenesis, given their aggressive behavior. The ascension of the expression of COX-2 in the adenoma-carcinoma sequence of mucinous lesions was more pronounced when compared to serous tumors and this fact points to different oncogenic pathways for distinct histological types. It remains unknown, highly unfortunately, which is the clinical significance of the prominent expression of COX-2 in benign serous lesions, if any exists. Nevertheless, the lack of association between the COX-2 expression and proliferative activity, assessed through immunohistochemistry detection of nuclear Ki67, poses an interesting investigational challenge. By the results shown, or by some methodological bias, one may suggest that cell proliferation was not directly associated to the carcinogenic mechanisms related to COX-2. There is one interesting report ⁽²⁷⁾, in which Ki67 expression has been found weak in normal ovaries, moderate in prophylactic oophorectomy specimens (from women with higher risk for developing ovarian cancer) and strong in serous carcinomas, indicating that the proliferative index can be a tool for diagnosing precursor cancer lesions. In two other reports, similarly to the present study (although using different markers for cell proliferation), there was no correlation between expression of COX-2 and that of EGFR or HER-2/neu ^(12, 28).

A limiting aspect of the present sample is the small number of carcinomas, especially mucinous adenocarcinomas, which are very rare ⁽²⁾. Mucinous carcinomas may represent a separate entity from other types of ovarian tumors and account for only 3% of primary ovarian epithelial cancers. The majority of mucinous carcinomas, previously classified as primary ovarian cancer are, in fact, metastasis from the lesions originating in the gastrointestinal tract ⁽²⁹⁾.

Of note, a uniform method to evaluate COX-2 expression should be adopted in order to improve the comparison between studies. Inhibiting COX-2 can be a new alternative to prevent or to treat ovarian cancer and some current ongoing study protocols are in early progress to verify its clinical utility in the prevention of the disease and as an adjuvant therapy ^(30, 31). Overexpression of COX-2 in ovarian tumors strongly encouraged clinical trials aimed at determining the potential uses of the enzyme inhibitors as adjuvant treatment and preventive options, but recent concerns have been raised after the withdrawal of a specific COX-2 inhibitor from the market because of cardiovascular effects. It is suspected that a class effect may be present, and other COX-2 inhibitors are currently under severe scrutiny ⁽³²⁾. Moreover, recent data is at variance with the concept that COX-2 overexpression is central to carcinogenesis. Looking at the present series, the lack of correlation between the expression of COX-2 and Ki67 suggests that the pathological mechanisms in which COX-2 is involved are most likely not directly related to the cell proliferation activity. Importantly, recent investigations and re-analysis of previous notions have pointed to the fact that COX-2 expression is a byproduct of the carcinogenetic processes, not their cause ⁽³³⁾. Caution is therefore recommended while expecting future clinical usages of the knowledge under construction with regards to COX-2 expression in neoplasms, with ovarian malignancies there included.

Acknowledgments

This study was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), process number 04/09309-5 and Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 307252/2004-3.

References

- (1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;**55**:74-108.
- (2) Scott M, McCluggage WG. Current concept in ovarian epithelial tumorigenesis: correlation between morphological and molecular data. *Histol Histopathol* 2006;**21**:81-92.
- (3) Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;**164**:1511-8.
- (4) Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Doré M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Hum Reprod Update* 2004;**10**:373-85.
- (5) Doré M, Côté LC, Mitchell A, Sirois J. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem* 1998;**46**:77-84.
- (6) Mao JT, Cui X, Reckamp K *et al.* Chemoprevention strategies with cyclooxygenase-2 inhibitors for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2005;**7**:30-9.
- (7) Choe MS, Zhang X, Shin HJ, Shin DM, Chen ZG. Interaction between epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 mediated pathways and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2005;**4**:1448-55.
- (8) Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE *et al.* Aberrant crypt foci. *Anticancer Res* 2006;**26**: 107-19.

- (9) Gallicchio L, McSorley MA, Newschaffer CJ *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. *Cancer* 2006;**106**:1443-52.
- (10) Dursun P, Gultekin M, Yuce K, Ayhan A. Lower expression of cyclooxygenase-2: is it associated with development of borderline ovarian tumors? *Med Hypotheses* 2005;**64**:273-8.
- (11) Li S, Miner K, Fannin R, Barrett JC, Davis BJ. Cyclooxygenase-1 and 2 in normal and malignant human ovarian epithelium. *Gynecol Oncol* 2004;**92**:622-7.
- (12) Ferrandina G, Raneletti FO, Lauriola L *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002;**85**:305-10.
- (13) Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Jahan I, Alam SM, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2006;**15**:21-5.
- (14) Matsumoto Y, Ishiko O, Deguchi M, Nakagawa E, Ogita S. Cyclooxygenase-2 expression in normal ovaries and epithelial neoplasms. *Int J Mol Med* 2001;**8**:31-6.
- (15) Kaern J, Aghmesheh M, Nesland JM *et al.* Prognostic factors in ovarian carcinoma stage III patients. Can biomarkers improve the prediction of short- and long-term survivors? *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**:1014-22.
- (16) Kritpracha K, Hanprasertpong J, Chandeying V, Dechsukhum C, Geater A. A survival analysis in advanced epithelial ovarian carcinoma in relation to proliferative index of MIB-1 immunostaining. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;**31**:268-76.
- (17) FIGO Cancer Committee. Staging announcement. *Gynecol Oncol* 1986;**25**:383-5.

- (18) Remmele W, Schickelanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993;**189**:862-6.
- (19) R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>.
- (20) Ferrandina G, Zannoni GF, Ranelletti FO *et al*. Cyclooxygenase-2 expression in borderline in ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2004;**95**:46-51.
- (21) Seo SS, Song YS, Kang D *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;**92**:927-35.
- (22) Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenase 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Acta* 1999;**1438**:120-30.
- (23) Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L *et al*. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;**94**:657-62.
- (24) Rodríguez IM, Prat J. Mucinous tumors of the ovary. A clinicalpathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2002;**26**:139-52.
- (25) Hess V, A'Hern R, Nasiri N *et al*. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol* 2004;**22**:1040-4.

- (26) Kurman RJ, Seidman JD, Shih I-M. Serous borderline tumors of the ovary. *Histopathology* 2005;**47**:310-8.
- (27) Schlosshauer PW, Cohen CJ, Llorca FP *et al.* Prophylactic oophorectomy a morphologic and immunohistochemical study. *Cancer* 2003;**98**:2599-606.
- (28) Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I *et al.* The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. *Cancer* 2003;**98**:1423-9.
- (29) Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol* 2004;**23**:41-4.
- (30) Khalifeh I, Munkarah AR, Lonardo F *et al.* Expression of COX-2, CD 34, Bcl-2 and p 53 and survival in patients with primary peritoneal serous carcinoma and primary ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2004;**23**:162-9.
- (31) Munkarah A, Ali-Fehmi R. COX-2: a protein with an active role in gynecological cancers. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;**17**:49-53.
- (32) Rigas B, Kashfi K. Cancer prevention: a new era beyond cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**314**:1-8.
- (33) Kashfi K, Rigas B. Is COX-2 a “collateral” target in cancer prevention? *Biochem Soc Trans* 2005;**33**:724-7.

Table 1 – Histopathological and clinical features of the cases

		Serous	Mucinous
Histopathology			
Benign		67 (59%)	48 (57%)
	<i>Mean age</i>	49.3	48.5
Borderline		15 (13%)	28 (33%)
	<i>Mean age</i>	39.8	40.8
Malignant		31 (28%)	9 (10%)
	<i>Mean age</i>	59.2	53.0
Total		113 (100%)	85 (100%)
	<i>Mean age</i>	50.7	46.4
FIGO stage			
Borderline			
I		10 (67%)	27 (96%)
II		2 (13%)	0
III/IV		3 (20%)	1 (4%)
Carcinoma			
I		9 (29%)	5 (55%)
II		1 (3%)	1 (11%)
III/IV		21 (68%)	3 (34%)
Grade			
Low grade		4 (12%)	6 (66%)
Moderate grade		19 (61%)	3 (33%)
High grade		8 (26%)	-

Table 2 – Percentage of COX-2 and Ki67 expressions in ovarian serous and mucinous tumors: benign, borderline and malignant

Tumor marker	Benign Positive/total	Borderline Positive/total	Malignant Positive/total	p*
COX-2				
Serous	40/67 (60%)	11/15 (73%)	26/31 (84%)	0.015
Mucinous	4/48 (8%)	13/28 (46%)	8/9 (89%)	<0.001
Ki67				
Serous	18/67 (27%)	6/15 (40%)	24/31 (77%)	<0.01
[mean of positive (range)]**	[8.3 (1.0 to 20.5)]	[11.5 (1.8 to 23.7)]	[34.6 (2.6 to 65.7)]	
Mucinous	7/48 (15%)	19/28 (68%)	7/9 (78%)	<0.01
[mean of positive (range)]**	[23.3 (3.1 to 39.4)]	[28.4 (4.8 to 44.4)]	[29.5 (13.3 to 41.1)]	

* chi-square for trends

** mean percentage of cells expressing Ki67

Legend to figure 1: Percentage of nuclei stained for Ki67 against COX-2 intensity in ovarian neoplasms

Legend to figure 2: positive COX-2 expression in different tumors (original magnification 400X) a) serous adenoma b) serous borderline tumor c) serous carcinoma d) mucinous adenoma e) borderline mucinous tumor f) mucinous carcinoma

Legend to figure 3: positive Ki67 expression (original magnification 400X) a) serous adenoma b) serous borderline tumor c) serous carcinoma d) mucinous adenoma e) mucinous borderline tumor f) mucinous carcinoma

Figura 1

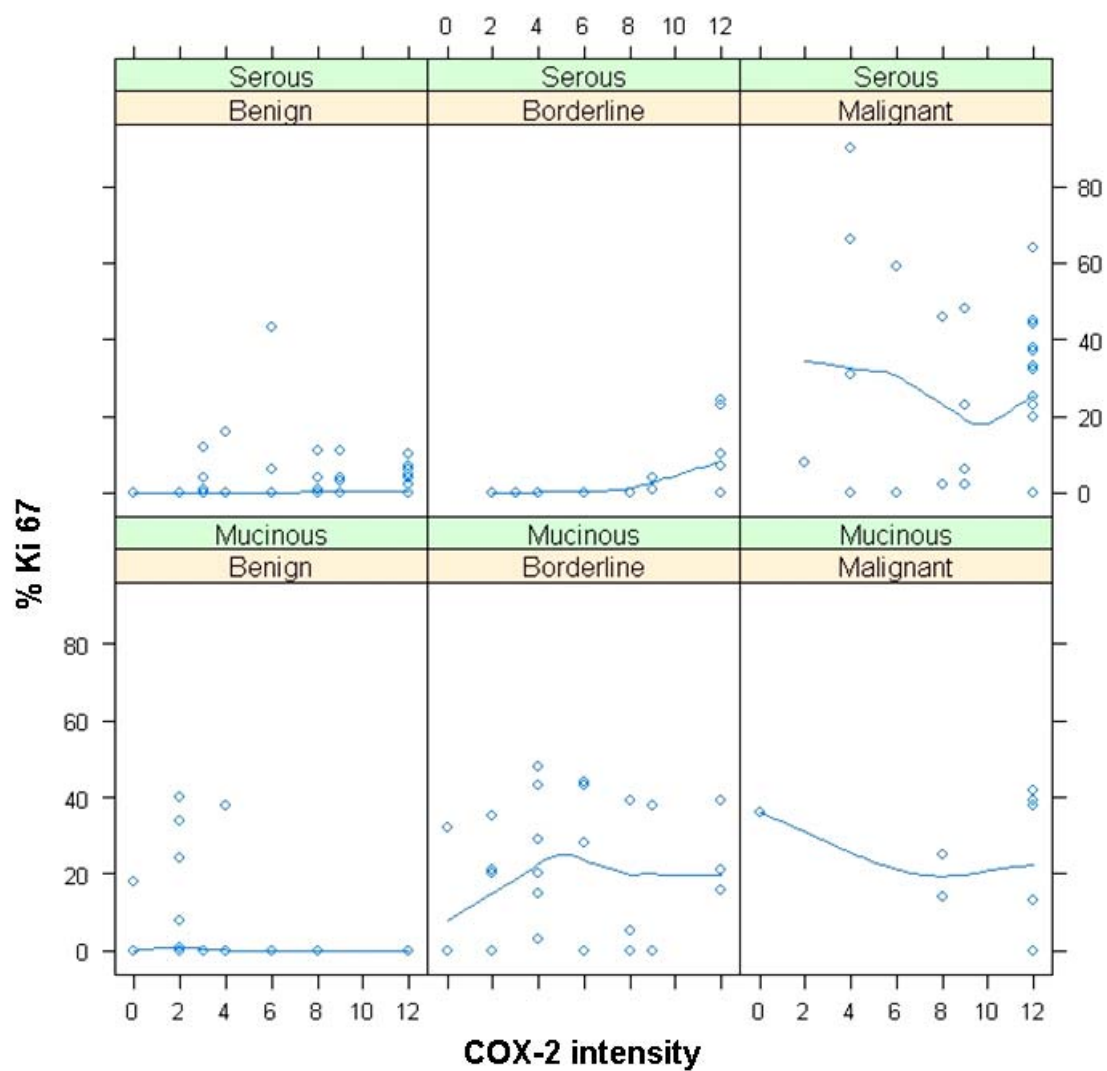


Figura 2

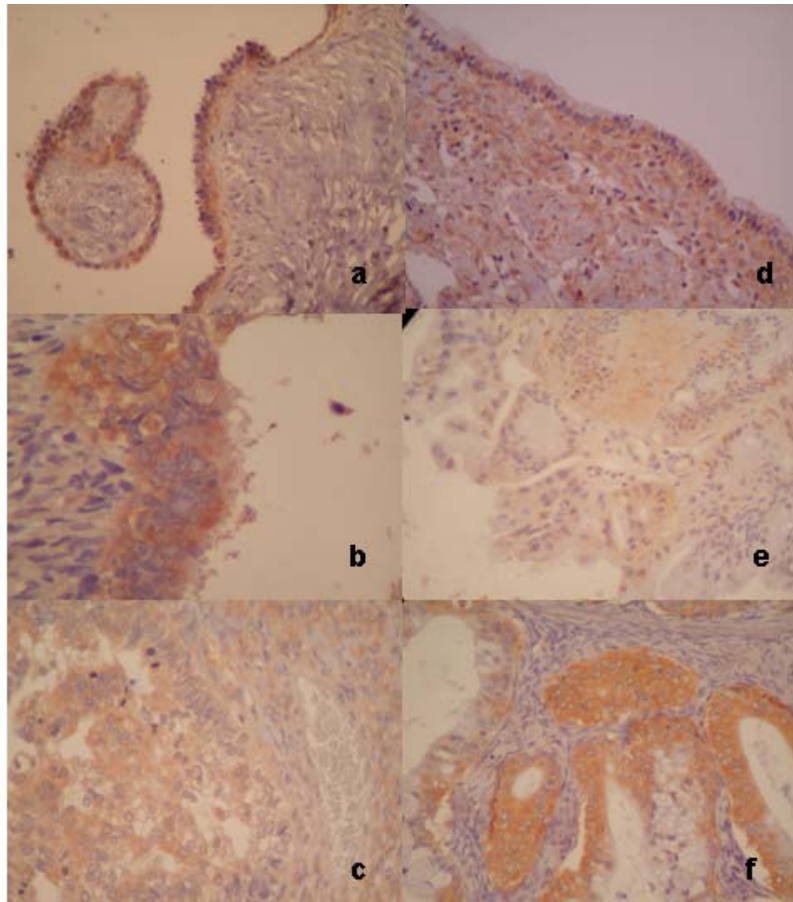
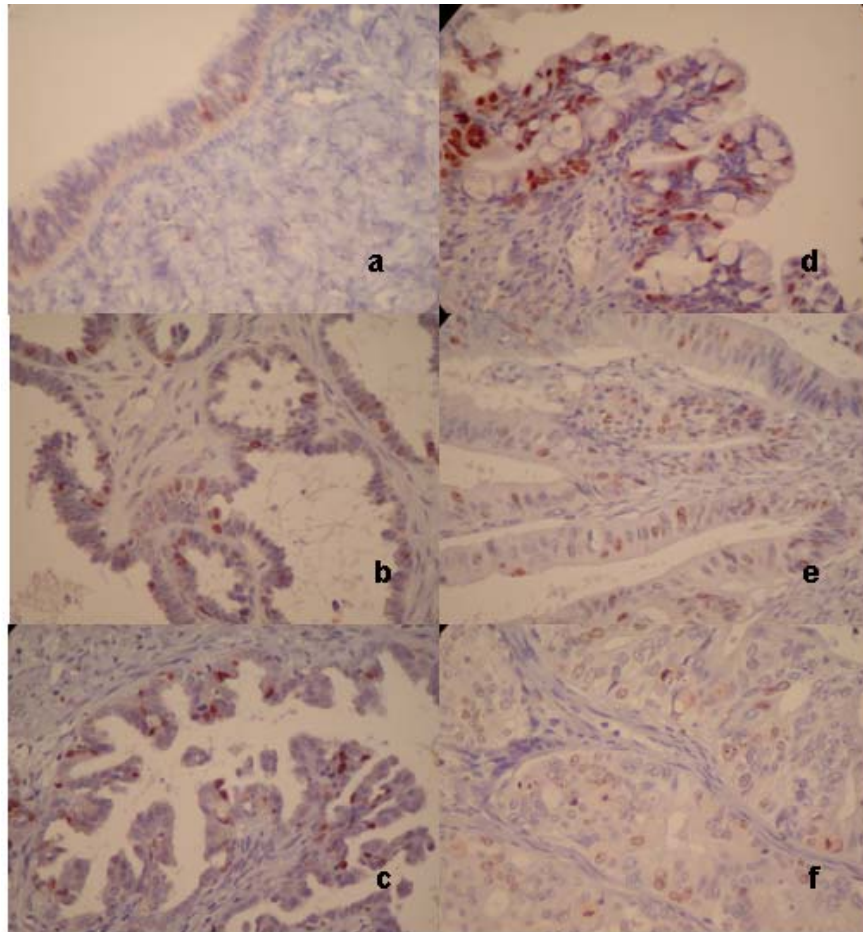


Figura 3



4. Conclusões

- A COX-2 e o Ki67 apresentaram um aumento progressivo da sua expressão acompanhando o gradiente de malignidade tanto no subtipo seroso quanto mucinoso.
- Apenas a expressão da COX-2 foi significativamente maior nos adenomas serosos quando comparados com os adenomas mucinosos. Não houve diferença na expressão da COX-2 e do Ki67 comparando-se tumores seroso e mucinoso, maligno e benigno.
- A expressão da COX-2 não esteve relacionada à expressão do Ki67 nestes tumores.

5. Referências Bibliográficas

Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I, Malone JM, Morris R, Lawrence WD et al. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. **Cancer** 2003; 98:423-9.

Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, Kulavlat M et al. Aberrant crypt foci. **Anticancer Res** 2006; 26: 107-19.

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta, GA:
American Cancer Society [online] 2006 [acessado em 14 fev 2006]. Disponível em: URL: <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2005f4PWSecured.pdf>

Auersperg N, Wong AST, Choi KC, Kang SK, Leung PCK. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. **Endocrin Rev** 2001; 22:255-88.

Auersperg N, Ota T, Mitchell GWE. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. **Int J Gynecol Cancer** 2002; 12:691-703.

Baron JA. Epidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer. Prog Exp **Tumor Res** 2003; 37:1-24.

Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect the risk of developing ovarian cancer ? A meta-analysis. **Br J Clin Pharmacol** 2005; 60: 194-203.

Choe MS, Zhang X, Shin HJ, Shin DM, Chen ZG. Interaction between epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 mediated pathways and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer. **Mol Cancer Ther** 2005; 4:1448-55.

Drake JG, Becker JL. Aspirin - induced inhibition of ovarian tumor cell growth. **Obstet Gynecol** 2002; 100:677-82.

Dursun P, Gultekin M, Yuce K, Ayhan A. Lower expression of cyclooxygenase-2: is it associated with development of borderline ovarian tumors? **Med Hypotheses** 2005; 64:273-8.

Ferrandina G, Raneletti FO, Lauriola L, Fanfani F, Legge F, Mattolese M et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2002; 85:305-10.

Ferrandina G, Zannoni GF, Ranelletti FO, Legge F, Gessi M, Salutari V et al. Cyclooxygenase-2 expression in borderline in ovarian tumors. **Gynecol Oncol** 2004; 95:46-51.

Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. **Mol Cell Endocrinol** 2006; 247:4-21.

Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Jahan I, Alam SM, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. **Oncol Rep** 2006; 15:21-5.

Gallicchio L, McSorley MA, Newschaffer CJ, Thuita LW, Huang HY, Hoffman SC et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. **Cancer** 2006; 106: 1443-52.

Hayes EC, Rock JA. COX-2 inhibitors and their role in gynecology. **Obstet Gynecol Surv** 2002; 57:768-80.

Huober J, Meyer A, Wagner U, Wallwiener D. The role of neoadjuvant chemotherapy and interval laparotomy in advanced ovarian cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128:153-60.

Kurman RJ, Seidman JD, Shih I-M. Serous borderline tumors of the ovary. **Histopathology** 2005; 47:310-8.

Li M, Qi SY, Wang Y, Feng SX, Zhang BZ, Wang R. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and Bcl-2 in borderline ovarian tumors. **Arch Gynecol Obstet** 2005; 272:48-52.

Mao JT, Cui X, Reckamp K, Liu M, Krysan K, Dalwadi H et al. Chemoprevention strategies with cyclooxygenase-2 inhibitors for lung cancer. **Clin Lung Cancer** 2005; 7:30-9.

O'Neill CJ, Deavers DT, Malpica A, Foster H, McCluggage WG. An immunohistochemical comparison between low grade and high grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB-1, bcl-2, Her-2/neu and c-kit in high grade neoplasms. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1034-41.

Pascalichio JC, Fristachi CE, Castanho PROL, Kue CM, Piatto S, Baracat FF. Epidemiologia do Câncer de ovário no Brasil. **RSBC** 2000; 11:46-53.

Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Boddi V, Taddei GL. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170 (MDR1) expression is associated with chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15:255-60.

Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Boddi V, Taddei GL. COX-2 and preoperative CA-125 level are strongly correlated with survival and clinical responsiveness to chemotherapy in ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 85:493-8.

Rodríguez IM, Prat J. Mucinous tumors of the ovary. A clinicalpathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:139-52.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, De Angelo LAA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki 67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol*. In press 2006.

Schildkraut JM, Moorman PG, Halabi S, Calingaert B, Marks JR, Berchuck A. Analgesic drug use and risk of ovarian cancer. *Epidemiology* 2006; 17:104-7.

Scott M, McCluggage WG. Current concept in ovarian epithelial tumorigenesis: correlation between morphological and molecular data. *Histol Histopathol* 2006; 21:81-92.

Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 41-4.

Seo SS, Song YS, Kang D, Park IA, Bang YJ, Kang SB et al. Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. ***Gynecol Oncol*** 2004; 92:927-35.

Shigemasa K, Tian X, Gu L, Shiroyama Y, Nagai N, Ohama K. Expression of cyclooxygenase-2 and its relationship to p53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. ***Int J Oncol*** 2003; 22:99-105.

Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. ***Am J Pathol*** 2004;164:1511-8.

Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Doré M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. ***Hum Reprod Update*** 2004; 10:373-85.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. ***Annu Rev Pharmacol Toxicol*** 1998; 38:97-120.

6. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Ficha de coleta de dados para neoplasia ovariana

Número do caso: |_|_|_|_|

Iniciais: |_|_|_|_|_|_|_|_|

Idade |_|_|

Tipo histológico: |_|_| seroso |_|_| mucinoso

Diagnóstico: |_|_| benigno |_|_| borderline |_|_| maligno

Nos malignos: grau histológico: |_|_| grau I |_|_| grau II |_|_| grau III

Reação de imunoistoquímica

Anticorpo	No. biópsia	Ano	Data da reação	Diluição do ac	Controle pos/neg
COX-2					
Ki 67 (MIB-1)					

Leitura da coloração:

Avaliação subjetiva da COX-2:

	Patologista 1	Patologista 2	Reavaliação Final
Ausente (0)			
Fraca (1)			
Moderada (2)			
Forte (3)			

Avaliação objetiva da COX-2 :

% das células coradas : _____

Avaliação objetiva do Ki 67 :

% das células coradas : _____

7.2. Anexo 2 – Distribuição das mulheres incluídas no estudo

Numero do bloco	Ano	Idade	Tipo histológico	Estádio	Grau histológico	Escore COX-2 (1)	Escore COX-2 (2)	Escore COX-2 (consenso)	Ki67
110	97	70	adenoma mucinoso	NA	NA	2	2	2	0
264	97	13	adenoma seroso	NA	NA	2	3	2	43,37
384	97	39	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
665	97	74	borderline mucinoso	I a	NA	1	1	1	0
792	97	50	adenoma seroso	NA	NA	0	1	0	0
1421	97	70	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
1708	97	25	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
1784	97	21	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	0
2196	97	71	adenoca seroso	II a	grau II	2	3	3	48,09
2246	97	72	adenoca seroso	III c	grau II	3	3	3	0
2780	97	52	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	1	0
2799	97	56	borderline mucinoso	I c	NA	2	1	2	43,33
2988	97	46	adenoca seroso	III a	grau II	2	3	2	2,28
3039	97	53	borderline seroso	I a	NA	2	3	3	0
3057	97	23	adenoma seroso	NA	NA	1	2	2	10,86
3206	97	35	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
4605	97	15	borderline seroso	I c	NA	2	1	1	0
4856	97	25	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
5218	97	38	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
5707	97	37	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
6199	97	64	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	32,19
8050	97	36	borderline mucinoso	I a	NA	1	2	2	2,97
9522	97	51	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
9651	97	65	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
9988	97	61	borderline mucinoso	I a	NA	2	2	2	39,38
10737	97	83	adenoma seroso	NA	NA	3	2	2	0
11157	97	41	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
11355	97	28	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
11996	97	53	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
12246	97	76	adenoca seroso	III c	grau III	2	2	2	65,57
29	98	36	adenoma mucinoso	NA	NA	1	0	1	0
30	98	47	borderline seroso	I a	NA	2	3	3	0
667	98	18	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
789	98	62	adenoma seroso	NA	NA		2	2	0
2122	98	49	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	44,39
2663	98	38	borderline seroso	III c	NA	2	3	2	0
3222	98	40	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	1,47
3293	98	75	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	1	0
4417	98	58	adenoma mucinoso	NA	NA	2	2	2	0
4767	98	21	borderline mucinoso	I a	NA	3	2	2	15,32
5053	98	50	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
5346	98	58	borderline mucinoso	I a	NA	1	1	1	0
5625	98	35	borderline mucinoso	I a	NA	2	2	2	42,72

Numero do bloco	Ano	Idade	Tipo histológico	Estádio	Grau histológico	Escore COX-2 (1)	Escore COX-2 (2)	Escore COX-2 (consenso)	Ki67
6857	98	65	adenoca seroso	III c	grau III	4	4	4	33,13
7182	98	25	borderline mucinoso	I a	NA	1	0	1	0
7471	98	65	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	2,3
7595	98	77	cistadenofibroma seroso	NA	NA	4	4	4	3,91
7743	98	30	adenoca mucinoso	I a	grau I	4	4	4	0
8253	98	65	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	32,37
8529	98	47	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
8809	98	69	cistadenofibroma mucinoso	NA	NA	1	2	2	0
9431	98	14	adenoma seroso	NA	NA	3	2	2	0
9483	98	48	borderline mucinoso	I a	NA	2	2	2	0
10065	98	12	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
10814	98	40	borderline seroso	I a	NA	4	4	4	22,6
10962	98	43	adenoma seroso	NA	NA	3	2	3	0
11192	98	46	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
11902	98	57	adenoca seroso	III c	grau I	3	2	2	0
12066	98	34	borderline mucinoso	I c	NA	2	2	2	44,27
12433	98	41	adenoca mucinoso	I a	grau I	2	2	2	25
263	99	53	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
920	99	50	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
2597	99	50	adenoma seroso	NA	NA	1	3	3	0
4521	99	71	adenoca mucinoso	III c	grau II	4	4	4	38,7
5312	99	62	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	2,1
5871	99	34	adenoma seroso	NA	NA	4	2	4	3,49
6499	99	34	borderline mucinoso	I a	NA	4	4	4	21,6
6820	99	72	borderline seroso	I a	NA	4	2	4	0,99
7586	99	47	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
7641	99	36	adenoca mucinoso	III a	grau I	4	2	4	0
8546	99	56	adenoma mucinoso	NA	NA	1	2	1	0
8621	99	49	borderline ser e muc	II c	NA	1	1	1	0
10158	99	30	borderline mucinoso	I a	NA	2	1	2	19,92
10597	99	73	adenoca seroso	I a	grau III	4	4	4	0
11296	99	18	borderline mucinoso	I a	NA	0	0	0	0
11311	99	42	borderline mucinoso	I a	NA	2	2	2	0
11560	99	66	adenoca mucinoso	III c	grau II	0	0	0	36,36
11678	99	26	borderline mucinoso	I b	NA	4	4	4	0
11783	99	60	adenoca seroso	III c	grau II	1	1	1	8,43
12299	99	61	adenoca seroso	I c	grau II	4	4	4	0
285	2000	56	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	5,63
431	2000	50	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	0	0
997	2000	77	borderline mucinoso	I a	NA	2	1	3	0
1124	2000	35	adenoma mucinoso	NA	NA	2	2	2	0
1234	2000	42	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
1505	2000	40	adenoma seroso	NA	NA	0	1	1	0
1533	2000	74	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
2351	2000	53	adenoca seroso	III c	grau II	2	2	2	58,51
2782	2000	37	adenoca seroso	III c	grau II	2	2	2	0

Numero do bloco	Ano	Idade	Tipo histológico	Estádio	Grau histológico	Escore COX-2 (1)	Escore COX-2 (2)	Escore COX-2 (consenso)	Ki67
3100	2000	70	adenoma mucinoso	NA	NA	1	0	1	0
4714	2000	48	cistadenofibroma seroso	NA	NA	4	4	4	10,31
5902	2000	59	adenoma seroso	NA	NA	1	2	2	0
6697	2000	49	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
7711	2000	57	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	3,59
8074	2000	53	adenoca mucinoso	I a	grau I	3	2	2	13,55
9257	2000	22	borderline mucinoso	I a	NA	3	3	3	15,8
9431	2000	64	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
9760	2000	25	cistadenofibroma seroso	NA	NA	1	2	2	0
9918	2000	59	adenoca seroso	I b	grau I	4	4	4	0
11229	2000	69	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	1	0
11387	2000	53	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	7,83
11742	2000	33	cistadenofibroma seroso	NA	NA	2	2	2	0
11859	2000	59	adenoma seroso	NA	NA	0	0	0	0
649	2000	16	borderline seroso	I b	NA	4	4	4	6,54
9	2001	47	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
469	2001	48	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
1661	2001	61	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	0
2084	2001	71	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	20,48
2206	2001	70	adenoma seroso	NA	NA	3	2	3	0
2413	2001	33	adenoca seroso	I c	grau I	3	2	3	22,66
2837	2001	24	borderline mucinoso	I a	NA	4	4	4	39,14
3006	2001	37	borderline mucinoso	III c	NA	2	3	2	4,68
3557	2001	24	borderline mucinoso	I a	NA	2	2	2	48,02
3578	2001	26	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	37,35
4484	2001	62	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	0
4951	2001	47	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
5121	2001	32	adenoma seroso	NA	NA	1	2	2	4,4
5454	2001	50	borderline mucinoso	I a	NA	0	0	0	32,02
6515	2001	44	borderline mucinoso	I a	NA	1	1	1	0
6643	2001	53	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	0	0
6755	2001	53	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0,99
6843	2001	65	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	0
7319	2001	70	adenoma seroso	NA	NA	3	2	3	10,76
8135	2001	57	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	39,97
8177	2001	13	adenoma mucinoso	NA	NA	2	2	2	0
8256	2001	59	adenoca mucinoso	I c	grau I	3	3	3	12,68
8593	2001	46	cistadenofibroma seroso	NA	NA	1	1	1	0
8879	2001	55	adenoma mucinoso	NA	NA	0	2	2	0
9154	2001	23	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	0	0
10438	2001	28	borderline seroso	II b	NA	2	2	2	0
10551	2001	51	adenoca mucinoso	I c	grau I	2	3	3	37,81
10725	2001	47	borderline mucinoso	I c	NA	2	2	2	28,14
11386	2001	49	adenoma seroso	NA	NA	3	3	3	0
11515	2001	40	adenoma seroso	NA	NA	0	1	1	0
11693	2001	12	adenoma seroso	NA	NA	2	1	1	0
11971	2001	42	adenoma mucinoso	NA	NA	1	0	0	17,52

Numero do bloco	Ano	Idade	Tipo histológico	Estádio	Grau histológico	Escore COX-2 (1)	Escore COX-2 (2)	Escore COX-2 (consenso)	Ki67
12338	2001	72	adenoca seroso	III c	grau III	4	4	4	23,19
12461	2001	76	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	0
12676	2001	27	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	0	0
130	2002	55	borderline mucinoso	I a	NA	1	1	1	20,09
243	2002	70	cistadenofibroma seroso	NA	NA	1	1	1	0
1755	2002	50	adenoma seroso	NA	NA	2	1	2	0
2251	2002	49	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	24,36
2512	2002	42	adenoma seroso	NA	NA		1	0	0
2663	2002	43	adenoma mucinoso	NA	NA	2	1	2	0
3483	2002	46	adenoma mucinoso	NA	NA	4	2	4	0
3529	2002	60	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
3647	2002	26	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
3741	2002	43	adenoca seroso	III c	grau II	4	4	4	63,63
4320	2002	6	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
4616	2002	40	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
6083	2002	49	cistadenofibroma seroso	NA	NA	3	2	3	4,63
6286	2002	72	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	5,75
6633	2002	68	adenoca seroso	IV	grau II	4	4	4	25,28
6729	2002	72	adenoca seroso	III c	grau II	2	2	2	90
7633	2002	32	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
8321	2002	72	adenoca seroso	I a	grau I	4	4	4	0
8434	2002	58	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
8535	2002	53	borderline seroso	I c	NA	3	3	3	0
8761	2002	57	adenoca seroso	III c	grau III	4	4	4	38,24
8838	2002	24	borderline seroso	I a	NA	1	2	1	0
9456	2002	75	adenoma seroso	NA	NA	3	2	3	0
10556	2002	56	adenoma seroso	NA	NA	1	2	2	0
10889	2002	55	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
11692	2002	54	borderline seroso	I a	NA	3	2	3	0
707	2002	24	borderline seroso	III c	NA	4	4	4	10,14
520	2002	50	adenoca seroso	I b	grau III	4	4	4	44,82
1089	2003	78	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	33,95
1243	2003	60	borderline mucinoso	I a	NA	2	2	2	28,82
1504	2003	24	borderline mucinoso	I a	NA	4	4	4	38,21
1602	2003	23	borderline mucinoso	I a	NA	1	1	1	21,02
2353	2003	61	adenoma seroso	NA	NA	3	2	3	0
2655	2003	72	adenoma mucinoso	NA	NA	1	2	2	37,68
2901	2003	51	adenoma seroso	NA	NA	2	3	2	15,8
3153	2003	43	adenoma seroso	NA	NA	3	2	2	0
3183	2003	67	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0
3648	2003	29	cistadenofibroma seroso	NA	NA	4	2	4	0
3851	2003	59	cistadenofibroma seroso	NA	NA	1	1	1	0
4442	2003	48	adenoma mucinoso	NA	NA	0	1	0	0
6727	2003	36	adenoma seroso	NA	NA	1	1	1	12,07
6958	2003	47	adenoma mucinoso	NA	NA	1	1	1	0
6986	2003	53	adenoca seroso	I b	grau II	4	4	4	24,53
7039	2003	51	adenoma seroso	NA	NA	4	2	4	3,66

Numero do bloco	Ano	Idade	Tipo histológico	Estádio	Grau histológico	Escore COX-2 (1)	Escore COX-2 (2)	Escore COX-2 (consenso)	Ki67
7368	2003	50	adenoca seroso	I c	grau II	3	3	3	5,99
7655	2003	64	adenoma seroso	NA	NA	2	2	2	0,59
8336	2003	70	adenoca mucinoso	II b	grau II	4	4	4	42,19
9084	2003	74	adenoca seroso	I a	grau III	2	3	2	31,24
9430	2003	65	adenoca seroso	III c	grau II	2	3	3	33,15
10007	2003	58	borderline mucinoso	I a	NA	1	2	1	34,6
9800	2003	57	adenoca seroso	III c	grau III	2	2	2	45,98
10409	2003	57	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	0
11023	2003	77	adenoma seroso	NA	NA	4	4	4	7,26
11163	2003	39	borderline seroso	I a	NA	4	4	4	4,05
11828	2003	31	adenoma mucinoso	NA	NA	2	0	2	0
12213	2003	59	adenoma mucinoso	NA	NA	0	0	0	0
12321	2003	64	cistadenofibroma seroso	NA	NA	1	2	2	0
12361	2003	57	adenoma seroso	NA	NA	1	2	1	0
707	2003	45	borderline seroso	III b	NA	4	4	4	23,8

7.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8931
FAX (0_19) 3788-7181
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.htm
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 19/10/04.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 406/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EXPRESSÕES DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 POR TUMORES EPITELIAIS DE OVÁRIO BENÍGNOS E MALÍGNOS E POR OVÁRIOS NORMAIS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sophie Françoise Mauricette Derchain

INSTITUIÇÃO: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher/CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 18/08/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/10/05

II - OBJETIVOS

Avaliar a expressão de ciclooxigenase por tumores epiteliais de ovário, benignos ou malignos, e por ovários normais.

III - SUMÁRIO

Para a realização do projeto, serão avaliados laudos anatomo-patológicos obtidos no período compreendido entre 1997 e 2003. As amostras que atenderem aos critérios de inclusão serão catalogadas e avaliadas quanto a presença de COX-1 e/ou COX-2. Para isso serão utilizadas técnicas imunohistoquímicas. Aproximadamente 300 blocos serão avaliados para obtenção dos dados.

Os dados serão tratados estatisticamente para finalização do projeto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Os pesquisadores solicitam dispensa do Termo de Consentimento, uma vez que não serão identificados os pacientes e as amostras já foram coletadas há até 7 anos. Também é salientado que existe uma grande dificuldade e alto custo para a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podendo assim ser dispensado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após analisar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de outubro de 2004.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 15/02/05
(PARECER PROJETO 406/2004)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

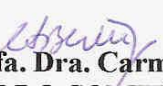
PROJETO: “EXPRESSÕES DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 POR TUMORES EPITELIAIS DE OVÁRIO BENÍGNOS E MALÍGNOS E POR OVÁRIOS NORMAIS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sophie Françoise Mauricette Derchain

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que acrescenta a avaliação da presença de Ki 67, VEGF e CD34 através de técnicas de imunoistoquímica e a retirada de avaliação da COX-1, bem como a realização de 4 cortes para cada bloco e a avaliação do Ki 67, VEGF e CD34 apenas nos blocos de tumores benignos e malignos de ovário, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP