



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Maria Carolina Szymanski de Toledo

Aspectos histopatológicos dos tumores *borderline* e
análise imuno-histoquímica da expressão de receptores
esteroides, HER2 e VEGF na transição adenoma –
borderline – carcinoma dos tumores serosos de baixo grau
e mucinosos do ovário

Histopathological features of borderline tumors and immunohistochemical
analysis of steroid receptors, HER2 and VEGF expression in the adenoma
– borderline – carcinoma transition of low-grade serous carcinoma and
mucinous ovarian carcinoma

CAMPINAS

2018

Maria Carolina Szymanski de Toledo

Aspectos histopatológicos dos tumores *borderline* e
análise imuno-histoquímica da expressão de receptores
esteroides, HER2 e VEGF na transição adenoma –
borderline – carcinoma dos tumores serosos de baixo grau
e mucinosos do ovário

Histopathological features of borderline tumors and immunohistochemical
analysis of steroid receptors, HER2 and VEGF expression in the adenoma
– borderline – carcinomatransition of low-grade serous carcinoma and
mucinous ovarian carcinoma

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título
de Doutora em Ciências da Saúde, na área de concentração Oncologia
Ginecológica e Mamária.

*Thesis presented to the Post-Graduation Program in Tocoginecology of
the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as
part of the requirements required to obtain the Ph.D Degree in Health
Sciences in Gynecological and Mammary Oncology.*

ORIENTADOR: LUÍS OTÁVIO ZANATTA SARIAN

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. LUÍS OTÁVIO ZANATTA SARIAN.**

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7408-7610>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Sz93a Szymanski de Toledo, Maria Carolina, 1982-
Aspectos histopatológicos dos tumores *borderline* e análise imuno-histoquímica da expressão de receptores esteroides, HER2 e VEGF na transição adenoma - *borderline* - carcinoma dos tumores serosos de baixo grau e mucinosos do ovário / Maria Carolina Szymanski de Toledo. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Luís Otávio Zanatta Sarian.
Coorientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias ovarianas. 2. Biomarcadores. 3. Receptores hormonais. 4. Receptor erbB-2. 5. Fator de crescimento do endotélio vascular. I. Sarian, Luís Otávio Zanatta, 1974-. II. Derchain, Sophie Françoise Mauricette. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Histopathological features of borderline tumors and immunohistochemical analysis of steroid receptors, HER2 and VEGF expression in the adenoma - borderline - carcinoma transition of low-grade serous carcinoma and mucinous ovarian carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Ovarian neoplasms

Biomarkers

Hormone receptors

Receptor, erbB-2

Vascular Endothelial Growth Factor

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luís Otávio Zanatta Sarian [Orientador]

Júlio César Teixeira

Luiz Gustavo Oliveira Brito

Giovanni Mastrantonio Di Favero

Francisco José Cândido dos Reis

Data de defesa: 22-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO

MEMBROS:

- 1. Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sarian**
- 2. Prof. Dr. Júlio César Teixeira**
- 3. Prof. Dr. Luiz Gustavo Oliveira Brito**
- 4. Prof. Dr. Giovanni Mastrantonio Di Favero**
- 5. Prof. Dr. Francisco José Cândido dos Reis**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data:
22/02/2018

Dedicatória

A beleza da vida está na capacidade de amar, irrestritamente, de muitas formas a tudo que nos rodeia. E amar significa estar ao lado, cuidar, compreender, aceitar e ajudar no processo de crescimento mesmo que este possa ser doloroso. Nesses momentos, percebemos que pessoas e seres de luz, por vezes muito próximos, por vezes nem tanto, são mandados como anjos em nosso caminho para torná-lo menos árduo. Essas pessoas e estes seres fazem parte do que somos e do que alcançamos. E nada mais sincero e necessário do que reconhecer este cuidado. Assim, dedico esta tese:

Primeiramente, à minha mãe, Carmen, cuja batalha hercúlea criou filhos capazes de seguir seus sonhos e me mostrou a grandiosidade do mundo, dos pequenos atos e do aprimoramento constante.

À minha família e particularmente aos meus irmãos, Marco, Maria Angélica e Marcelo, que me apoiaram nesses caminhos, muitas vezes de forma psicológica e, em algumas vezes, de forma técnica.

Aos meus grandes amigos, fiéis e persistentes em sua missão de cuidar para que meu caminho seja mais feliz. Pessoas dotadas de uma luz especial, com uma grande capacidade em manter nossa esperança no mundo, às quais admiro muito e pelos quais tenho especial carinho.

Às pacientes deste estudo, que mesmo em meio a sua dor e sem nenhuma recompensa própria, com suas histórias, ora me comoveram, ora me incentivaram a persistir.

Ao meu sobrinho querido, Francisco, que neste momento repousa no ventre de sua mãe e em breve trará muita alegria às nossas vidas. Que venha com saúde!

Aos meus cães, Leelu, Luna e Sansão, por todo amor incondicional dedicado, mesmo não compreendendo em sua filosofia de vida canina o porquê e para quê, nós, humanos, corremos tanto.

A todas as orações e pensamentos positivos que me foram direcionados por vocês, que cruzaram meu caminho ou seguem comigo, lhes digo muito obrigada e que Deus, São Francisco, Nossa Senhora e seus anjos lhes abençoem e lhes retribuam de forma infinita.

Amém

Agradecimentos

*“As coisas tangíveis tornam-se insensíveis à palma da mão
Mas as coisas finas, muito mais que lindas, essas ficarão”*

(Carlos Drummond de Andrade)

Agradecer é entender que um pouco daquela pessoa, daquele instante, deixou em nós uma lembrança permanente e contribuiu para o que somos, fizemos e faremos.

Agradeço por todo esse caminho percorrido:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian, sempre atencioso e com muita paciência diante das minhas ansiedades profissionais, das minhas falhas e do meu processo de aprendizado. Muito obrigada; espero ter sido digna deste investimento e que um dia eu possa retribuir o que fez por mim.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Sophie Derchain, pessoa de grande valor e conhecimento, que me ensinou o valor da resiliência.

Aos membros da banca de qualificação; Prof. Dr. Júlio Teixeira, Prof. Dr. Luis Brito e Profa. Dra. Diama Bhadra que com seus conhecimentos e dedicações, contribuíram no aprimoramento deste trabalho.

À Prof. Dra. Liliana Aparecida Lucci Andrade, que com sua capacidade de docência ímpar e auxílio foi corresponsável pela idealização desta tese.

À Dra. Larissa Eloy Bastos, primordial em toda análise patológica, com sua visão aguçada pôde esmiuçar as sutilezas dos tumores.

À Dra. Geise, ao técnico Júlio e toda equipe do Laboratório de Patologia Experimental, sem os quais a execução da parte experimental deste trabalho não seria possível.

À toda equipe de funcionários do SAME, do Serviço de Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do HC Unicamp, do Ambulatório e da Secretaria de Oncologia do CAISM que, sempre solícitos, viabilizaram o atendimento às pacientes e o levantamento de dados clínicos e do material de análise.

Muito obrigada!

*“Fica sempre, um pouco de perfume
nas mãos que oferecem rosas
nas mãos que sabem ser generosas*

*Dar do pouco que se tem
ao que tem menos ainda
enriquece o doador,
faz sua alma ainda mais linda.*

*Dar ao próximo, alegria,
parece coisa tão singela
aos olhos de Deus, porém,
é das artes a mais bela”*

(Alberto Costa)

RESUMO

O carcinoma de ovário está dividido em subtipos I (e.g. serosos de baixo grau e mucinosos) e II (e.g. serosos de alto grau e carcinossarcomas). Os carcinomas serosos e mucinosos do subtipo I apresentam-se de forma indolente e podem evoluir a partir de tumores *borderline* serosos e mucinosos; podendo estes serem considerados lesões precursoras daqueles. Atualmente, há uma procura por características histopatológicas nos tumores *borderline* relacionadas ao maior risco de progressão para invasão, e, marcadores proteicos nos carcinomas com valor terapêutico. Os objetivos dessa tese foram: 1) comparar as características histopatológicas dos tumores *borderline* serosos/seromucinosos e mucinosos com as características clínicas das mulheres; 2) comparar as expressões do RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona), HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) entre as áreas benignas, *borderline* e invasoras dos carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos, e relacionar essas expressões com as características clínicas das mulheres. Foram selecionados todos os blocos de parafina e prontuários de mulheres com diagnóstico de tumor *borderline* seroso/seromucinoso, mucinoso, carcinoma seroso de baixo grau e carcinoma mucinoso tratadas no CAISM de 1995 a 2015, seguidas até fevereiro de 2017. A análise estatística foi feita através do programa R®, com nível de significância de 5%. Como resultado do objetivo 1 encontramos associação significativa da microinvasão com os níveis de CA125 ($p=0,04$) e com os subtipos serosos/seromucinosos ($p=0,02$). Como resultados do objetivo 2 encontramos: a) aumento da expressão do RP, HER2 e VEGF na transição de adenoma – *borderline* – carcinoma dos carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos ($p < 0,05$); b) associação significativa dos níveis de CA125 com as expressões do RE, RP, HER2 e VEGF nas transições de adenoma para *borderline* e *borderline* para carcinoma ($p < 0,05$). Na transição de adenoma para *borderline*, o subtipo histológico se associou significativamente à expressão do RE, RP e HER2 ($p < 0,01$); a recidiva se associou à expressão do RE ($p < 0,01$) e o óbito se associou significativamente às expressões do RE e VEGF; c) na transição de *borderline* para carcinoma, além das associações similares àquelas encontradas na transição adenoma para *borderline*,

encontramos que a expressão do RP associou-se à recidiva ($p=0.04$). Desta forma, concluímos: a) houve uma associação significativa entre os níveis de CA125 e a microinvasão nos tumores *borderline* serosos/seromucinosos. Entretanto, não observamos associação da microinvasão com recidivas e/ou óbitos devido à baixa frequência destas ocorrências nos tumores *borderline*; b) as expressões dos RE, RP, HER2 e VEGF diferiram de forma significativa entre as áreas de adenoma, *borderline* e carcinoma dentro dos respectivos carcinomas, com aumento da expressão, principalmente no momento de transição da área de adenoma para a área de *borderline*. As características clínico-patológicas associadas com as mudanças nas expressões dos marcadores foram os níveis de CA125 (RE, RP, HER2), os estádios avançados, a recorrência (RE, RP) e o óbito (VEGF). Portanto, considerando as expressões dos marcadores proteicos, as áreas *borderline* encontradas no gradiente de transição adenoma - *borderline* - carcinoma, se assemelham às áreas invasoras.

Palavras-chave: neoplasias ovarianas, biomarcadores, receptores hormonais, HER2, VEGF.

ABSTRACT

Ovarian carcinoma is divided into subtypes I (e.g. low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinoma) and II (e.g. high-grade serous cancer and carcinosarcomas). Serous and mucinous subtype I carcinomas present indolently and may evolve from serous and mucinous borderline tumors, which can be considered their precursor lesions. Currently there is a search for histopathological features in borderline tumors related to higher risk of progression to cancer, and, protein markers in carcinomas with therapeutic value. The objectives of this thesis were: 1) to compare the histopathological characteristics of serous/seromucinous and mucinous borderline tumors with the clinical characteristics of these women; 2) to compare the expression of ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) among the benign, borderline and invasive areas of low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinomas; and to relate these expressions to the clinical characteristics of these women. We selected all paraffin blocks and medical records of women diagnosed with serous/seromucinous and mucinous borderline tumors, low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinoma treated at CAISM from 1995 to 2015, followed up until February 2017. Statistical analysis was performed using the R® program, with a significance level of 5%. As result of objective 1, we found a significant association of microinvasion with CA125 levels ($p=0.04$) and serous/seromucinous subtypes ($p=0.02$). As results of objective 2 we found: a) increased expression of PR, HER2 and VEGF in the transition of adenoma-borderline-carcinoma of low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinomas ($p<0.05$); b) significant association of CA125 levels with ER, PR, HER2 and VEGF expression in the adenoma to borderline and borderline to carcinoma transitions($p<0.05$). In the transition from adenoma to borderline, the

histological subtype was significantly associated with ER, PR and HER2 expression ($p < 0.01$); relapse was associated with ER expression ($p < 0.01$) and death was significantly associated with ER and VEGF expression; c) in the borderline to carcinoma transition, besides to the similar associations to those found in the adenoma to borderline transition, we found that PR expression was associated with relapse ($p = 0.04$). However, VEGF expression was no longer associated with death. Thus, we concluded: a) there was a significant association between CA125 levels and microinvasion in serous/seromucinous borderline tumors. However, we did not observe association of microinvasion with relapses and/or deaths due to the low frequency of these events in borderline tumors; b) the ER, PR, HER2 and VEGF expressions differed significantly among the adenoma, borderline and carcinoma areas within the respective carcinomas, with increased expression, especially at the stepadenoma to borderline transition. Clinical and pathological features associated with changes in markers' expressions were CA125 levels (ER, PR, HER2), advanced stages, relapse (ER, PR), and death (VEGF). Therefore, considering the protein markers' expressions, borderline areas found in adenoma-borderline-carcinoma transition gradient resemble invasive areas.

Key words: ovarian neoplasms, biomarkers, hormone receptors, HER2, VEGF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração	Título	Página
1	Histopathological patterns in serous and mucinous borderline tumors	72
2	Box plot representation of ER, PR, HER2 and VEGF expression in the adenoma, borderline and carcinoma components of ovarian tumors	98
3	Expression of ER, PR, HER2 and VEGF in adjacent adenoma-borderline-carcinoma areas within the same LGSC	99
4	Expression of ER, PR, HER2 and VEGF in adjacent adenoma-borderline-carcinoma areas within the same MOC	100

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Clinical characteristics of borderline ovarian tumors and microinvasion	69
2	Histopathological features of serous/seromucinous borderline ovarian tumors and microinvasion	70
3	Histopathological features of mucinous borderline ovarian tumors and microinvasion	71
1	Evolution of ER, PR, HER2 and VEGF expression in 48 cases with adenoma-borderline-carcinoma transition	93
2a	Changes in steroid receptor expression in the adenoma to borderline transition as related to key clinical features	94
2b	Changes in HER2 and VEGF expression in the adenoma to borderline transition as related to key clinical features	95
3a	Changes in steroid receptor expression in the borderline to carcinoma transition as related to key clinical features	96
3b	Changes in HER2 and VEGF expression in the borderline to carcinoma transition as related to key clinical features	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abreviatura, siglas e símbolos	Significado	Abreviatura, siglas e símbolos	Significado
®	Marca registrada	%	Porcentagem
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	@	arroba
BOT	<i>Borderline Ovarian Tumor</i>	< / > / + / -	Menor/ maior/ positivo/ negativo
BRAF	Gene que codifica proteína chamada B-raf	=	igual
CAISM	Centro Atenção Integral à Saúde da Mulher	APST	<i>Atypical proliferative serous tumor</i>
cm	Centímetro/ <i>centimeter</i>	CA,USA	<i>California, United States of America</i>
DMSO	dimetilsulfóxido	CA125	Marcador tumoral da família das mucinas
DTG	Departamento de Tocoginecologia	CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i> . Marcador tumoral: antígeno carcinoembrionário
e.g.	<i>Exempli gratia/ (for example)</i>	CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
EOC	<i>Epithelial ovarian cancer</i>	Erb-2	Oncogene localizado no cromossomo 17
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo	et al./ cols.	<i>et alii</i> (e outros)/ colegas
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia	FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FU	Follow-up	GCIG	<i>Gynecologic Cancer Intergroup</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>	GLOBOCAN	Portal na internet de pesquisa em câncer
IECA	<i>Intraepithelial carcinoma</i>	H&E	Hematoxilina e Eosina
IHC	Imuno-histoquímica	HGSC	<i>High grade serous cancer</i>
IRB	<i>International Board Review</i>	IMC/ BMI	Índice de Massa Corpórea/ <i>Body Mass Index</i>
Kg/m ²	Kilogram per square meter	MAPK Quinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (Proteínas-quinases ativadas por mitógenos)
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	MBT	<i>Mucinous borderline tumor</i>
LCSC	Low-grade serous cancer	mm	Milímetro/ <i>millimeter</i>
ml	mililitro	mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MOC	Mucinous ovarian carcinoma	NA	<i>Data not available</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>	ng/ml	Nanograma por mililitro
°C	Graus Celsius	RNM	Ressonância Nuclear Magnética
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/ <i>World Health Organization</i>	ROC	Curva de características do operador receptor
PAX8	<i>Paired-box gene 8</i>	SAME	Serviço de Arquivo Médico
RE/ER	Receptor de Estrógeno/ <i>Estrogen Receptor</i>	SBT	<i>Serous borderline tumor</i>
RP/PR	Receptor de Progesterona/ <i>Progesterone Receptor</i>	SOE	Sem outras especificações
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
vs	<i>versus</i>	U/ml	Unidade por mililitro
WT1	<i>Wilms tumor protein</i>	Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
α / β	Alfa/ Beta	US	Ultrassom

SUMÁRIO

1.	Introdução	16
1.1.	Epidemiologia.....	16
1.2.	Classificação.....	16
1.2.1.	Carcinomas serosos de baixo grau	17
1.2.2.	Carcinomas mucinosos.....	18
1.2.3.	Tumores <i>borderline</i> do ovário.....	19
1.3.	Risco de progressão de lesões precursoras (<i>borderline</i>) para carcinoma: o estudo da expressão de marcadores proteicos.....	26
1.3.1.	Receptores hormonais	27
1.3.2.	<i>Human Epidermal Growth Factor receptor 2</i> (HER2)	28
1.3.3.	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF): fator de crescimento endotelial vascular	30
1.4.	Justificativa.....	30
2.	Objetivos	33
2.1.	Objetivo geral:	33
2.2.	Objetivos específicos:	33
3.	Metodologia	34
3.1.	Desenho	34
3.2.	Tamanho amostral	34
3.3.	Seleção de sujeitos (material ou casuística)	35
3.4.	Variáveis e conceitos	36
3.5.	Técnicas, testes e exames.....	41
3.5.1.	Histologia.....	41
3.5.2.	Preparação do material para estudo imuno-histoquímico.....	43
3.5.3.	Análise da imuno-histoquímica.....	44
3.6.	Instrumentos para coleta de dados	45
3.7.	Coleta de dados.....	45
3.8.	Processamento e análise dos dados	46
3.9.	Aspectos éticos	48
3.10.	Financiamento.....	49
4.	Resultados	50
4.1.	Artigo 1.....	50
4.2.	Artigo 2.....	50
4.1.	Artigo 1	51
4.2.	Artigo 2	71
5.	Discussão geral.....	97
6.	Conclusão	107
7.	Referências	109
8.	Anexos.....	130
8.1.	Ficha de Coleta de Dados	130
8.2.	Ficha de Coleta de Dados (continuação).....	131
8.3.	Carta de aprovação do Comitê de Pesquisa	132

1.Introdução

1.1. Epidemiologia

Todo ano, aproximadamente 230.000 mulheres são diagnosticadas com câncer de ovário (7 para cada 100.000 mulheres). Dessas, 152.000 mulheres evoluem para óbito (4 para cada 100.000 mulheres) (GLOBOCAN), sendo mundialmente considerada a sétima causa de óbitos por câncer entre as mulheres (Naik et al. 2015).

1.2. Classificação

O carcinoma de ovário responde por 90% dos casos diagnosticados anualmente. O subtipo mais frequente é o carcinoma seroso de ovário, seguido do subtipo mucinoso primário de ovário (Piek et al. 2008). Até recentemente, o câncer de ovário era compreendido como sendo uma única entidade nosológica. Entretanto, o estudo da biologia molecular demonstrou que se trata de doenças diferentes e comportamentos biológicos distintos (Russel et al. 2004). Desde a proposição de Malpica e cols.(2004), classificam-se os carcinomas serosos em alto e baixo grau, e desde a

classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014, os carcinomas mucinosos se referem especificamente aos carcinomas mucinosos primários de ovário de padrão intestinal (Malpica et al. 2004; Kurman et al. 2014).

1.2.1. Carcinomas serosos de baixo grau

Os avanços moleculares nos permitiram compreender que os carcinomas serosos devem ser divididos em dois grupos com comportamentos biológicos distintos: os carcinomas serosos de alto grau e os carcinomas serosos de baixo grau. Os carcinomas serosos de alto grau correspondem a 90% dos casos, são os mais frequentemente estudados e possuem comportamento clínico agressivo, embora com boa resposta à quimioterapia. Apresentam ampla instabilidade genética e mutações de p53, sendo praticamente selvagens em relação às mutações da cadeia de sinalização MAPK quinase (BRAF/KRAS) (Vang et al. 2009). Os carcinomas serosos de baixo grau são tumores indolentes, geralmente diagnosticados em estádios avançados, apresentam baixa resposta aos tratamentos citotóxicos, apresentando mutações na cadeia BRAF/KRAS similares às aquelas encontradas nos tumores *borderline* serosos e, por conseguinte, sugerindo que tenham como lesões precursoras estes (Shih et al. 2004; Boyd et al. 2012).

Segundo os estudos mais recentes, existem três possíveis teorias para o aparecimento dos carcinomas serosos de baixo grau: 1) lesões *de novo* sem relação direta com fatores de risco estabelecidos; 2) lesões secundárias ao processo de tumorigênese, com transformação maligna secundária à degradação oxidativa dos cistos de inclusão epitelial do parênquima ovariano e 3) através de um *continuum* no processo de malignização, tendo como lesões precursoras os tumores *borderline* do ovário (Romero et al. 2013).

1.2.2. Carcinomas mucinosos

Os carcinomas mucinosos primários do ovário são tumores bem diferenciados, indolentes, que se apresentam usualmente como grandes massas abdominais. Histologicamente são formados por células colunares que se assemelham àquelas encontradas na mucosa intestinal (*giant cells*) e, por esta razão, eram anteriormente classificados como subtipo intestinal. Não fazem mais parte deste grupo nosológico, os tumores *müllerianos* ou os relacionados ao pseudomixoma, por se tratarem de tumores molecularmente distintos (Kim et al. 2014). Os carcinomas mucinosos bem diferenciados também apresentam com grande frequência a presença de um gradiente de evolução tumoral de adenoma para *borderline* para carcinoma (Kurman et al. 2008).

1.2.3. Tumores *borderline* do ovário

De acordo com o previamente exposto, observamos que os carcinomas serosos de baixo grau e os carcinomas mucinosos do ovário estão intimamente relacionados com os tumores *borderline* serosos e mucinosos, respectivamente. Os tumores *borderline* do ovário são neoplasias de origem epitelial, caracterizados por aumento da proliferação celular e presença de atipia nuclear leve a moderada, porém sem invasão do estroma (Seidman et al. 2002). Essa entidade foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1970 e renomeada na Classificação da OMS de 2014 como “tumor proliferativo atípico” (Hauptman et al. 2017).

Embora recentemente tenha se sugerido a substituição dos termos tumores *borderline* serosos e mucinosos para tumores serosos proliferativos atípicos e tumores mucinosos proliferativos atípicos, a nova classificação da OMS ainda aceita o termo *borderline*, que será utilizado nessa tese.

Atualmente estima-se que 10% a 20% das neoplasias ovarianas sejam tumores *borderline* de ovário, sendo 55% serosos, 35% mucinosos e 10% de subtipos mais raros – endometrióides, células claras e Brenner (Tropé et al. 2012). Essas neoplasias afetam mais frequentemente mulheres em idade reprodutiva e muitas vezes sem prole definida com desejo de manutenção da fertilidade (Helpman et al. 2015).

Mulheres com tumores *borderline* podem se apresentar ao consultório médico com queixas diversas dentre elas aumento do volume abdominal, dor pélvica e/ou irregularidade menstrual. Entretanto também podem ser assintomáticas, tendo como achado de exame de imagem a presença de uma lesão ovariana (Albu et al. 2016; Olsen et al. 2007).

Ao exame ultrassonográfico (US), estas lesões podem se apresentar como cistos complexos ou uniloculares. A ressonância nuclear magnética da pelve (RNM) pode ser solicitada para melhor caracterização das lesões (Borrelli et al. 2017; Lowry et al. 2017). Os marcadores tumorais CA125 e CEA não apresentam boa acurácia na diferenciação para este tipo de tumor (Jones et al. 2006; Medeiros et al. 2009). O diagnóstico definitivo é feito apenas após extirpação da lesão e resultado de anatomopatológico em parafina (Gershenson et al. 2016).

Uma vez feito o diagnóstico, o espectro terapêutico utilizado para as mulheres com tumores *borderline* do ovário é extremamente heterogêneo. As diretrizes gerais de estadiamento e tratamento do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomendam cirurgia exclusiva que inclui citologia de lavado peritoneal, ressecção completa da lesão através de cistectomia ou salpingooforectomia, com ou sem histerectomia, omentectomia, biópsias peritoneais, excisão de lesões suspeitas e apendicectomia nos tumores mucinosos (Ouldamer et al. 2016). A extensão

da cirurgia se correlaciona com as características histopatológicas do exame anatomopatológico de cada subtipo e seu risco para evolução para carcinoma podendo muitas vezes ser optado por estadiamento completo de acordo com os critérios da FIGO, conforme o realizado em carcinomas (Silva et al. 2006).

Os tumores *borderline* serosos em estágio inicial podem ser tratados apenas com a extirpação da lesão por cistectomia ou salpingooforectomia unilateral e estadiados com omentectomia, coleta de lavado peritoneal e biópsias múltiplas de peritônio. A salpingooforectomia contralateral e histerectomia são reservadas para mulheres com prole constituída (Vasconcelos et al. 2015). A linfadenectomia somente está indicada na presença de linfonodos aumentados (Shim et al. 2016). Uma revisão, incluindo 10 centros na Turquia com mais de 700 casos concluiu que a extensão da cirurgia não se relacionou com o prognóstico. Entretanto neste estudo os autores excluíram tumores *borderline* serosos com implantes invasivos. Os implantes invasivos são conglomerados celulares localizados em tecidos adjacentes ao ovário, com características histológicas semelhantes ao tumor original, porém que apresentam infiltração e destruição do tecido adjacente. Os implantes invasivos reclassificam os tumores *borderline* como carcinomas serosos de baixo grau, consequentemente devem ser tratados como tal (Gokcu et al. 2016). A sobrevida global das mulheres com tumores *borderline* serosos estágio I é

maior que 97%. Nos casos avançados com implantes invasivos, destruição linfonodal e recidiva, a sobrevida global se assemelha aos carcinomas serosos de baixo grau (67%) (Chen et al. 2017).

O tratamento cirúrgico padrão das mulheres com tumores *borderline* mucinosos é o mesmo que naquelas com tumores *borderline* serosos, acrescentando-se a apendicectomia. Entretanto, estudos recentes demonstram que a realização de apendicectomia em apêndices macroscopicamente normais não apresentou benefício na sobrevida global e na sobrevida livre de doença (Decker et al. 2017). Os tumores *borderline* mucinosos do ovário apresentam excelente prognóstico, pois 90% dos casos são diagnosticados no estágio I, sendo rara a recidiva e progressão da doença, conforme também observado por Seidman e cols. (Seidman et al. 2000; Seidman et al. 2002).

1.2.3.1 Tumores *borderline* serosos: características histopatológicas e imuno-histoquímica

Entre os tumores *borderline*, 55% são serosos (tumores serosos proliferativos atípicos). Estes podem se apresentar como variante micropapilífera ou cribriforme, com microinvasão e com implantes do tipo não invasivos. Também pode ser descrito acometimento linfonodal, entretanto, sem impacto sobre o prognóstico na maioria dos casos. Segundo a nova nomenclatura da OMS, de 2014, a variante micropapilífera do tumor

borderline seroso passou a ser carcinoma seroso papilífero de baixo grau não invasivo. A presença de padrão micropapilífero está significativamente associada à presença de implantes invasivos (Seidman et al. 2000). Os casos com implantes invasivos ou com substituição total do linfonodo pela neoplasia são agora classificados como carcinomas serosos de baixo grau (Hauptman et al. 2017; Okoye et al. 2016).

Na análise por imuno-histoquímica, os tumores *borderline* serosos são caracterizados pela expressão de WT1/ PAX8, Bcl2, receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) além de mutações nos genes KRAS e BRAF estarem presentes em 30% dos casos (Buttarelli et al. 2017; Showeil et al. 2016; Wang et al. 2016; Zeppernick et al. 2014). Além disso, os estudos têm demonstrado que as assinaturas moleculares dos tumores *borderline* serosos e dos carcinomas serosos de baixo grau são semelhantes (Kaldawy et al. 2016; Ferguson et al. 2015). Isto sugere um padrão de progressão de lesões precursoras para carcinoma (Horn et al. 2017). Malpica e cols. (2004) demonstraram a existência de um gradiente de evolução, com áreas de adenoma, tumor *borderline* e carcinoma invasor de baixo grau dentro do mesmo tumor. Observa-se uma perda de controle gênico sobre os processos de proliferação celular, precedendo a evolução para carcinoma seroso de baixo grau (Malpica et al. 2004). De acordo com alguns trabalhos, essas características são semelhantes nos tumores *borderline* e carcinomas

seromucinosos (Rambau et al. 2017); razão pela qual nesta tese agrupamos os mesmos com os tumores *borderline* e carcinomas serosos de baixo grau.

1.2.3.2 Tumores *borderline* mucinosos: características histopatológicas e imuno-histoquímica

Os tumores *borderline* mucinosos, também chamados de tumores mucinosos proliferativos atípicos, compreendem 35% dos tumores *borderline*. Histopatologicamente são descritas nestes tumores variantes com microinvasão, carcinoma intraepitelial (quando a atipia celular é marcada), carcinoma microinvasivo e nódulos murais, que estão associados a maior prevalência de lesão francamente invasora (Morice et al. 2012; Vasconcelos et al. 2016). O carcinoma intraepitelial está associado à maior taxa de recidiva, porém não altera o prognóstico (Hauptman et al. 2017).

Os tumores *borderline* mucinosos eram classificados em dois tipos celulares: a) tipo intestinal e b) tipo endocervical ou *mülleriano*. A grande maioria é do tipo intestinal, correspondendo a 85% dos casos, com a presença de epitélio mucinoso com células caliciformes. Atualmente, pela nova classificação da OMS de 2014, quando usamos o termo tumor mucinoso, estamos nos referindo apenas ao tumor do tipo intestinal (Kurman et al. 2014). O tumor *borderline* mucinoso do tipo endocervical ou *mülleriano* passou a constituir uma nova categoria de neoplasia, denominada de tumor seromucinoso.

Já foi descrito que os tumores *borderline* mucinosos (tipo intestinal) podem ser lesões precursoras dos carcinomas mucinosos do ovário. Como os carcinomas mucinosos de ovário são tumores grandes, a presença do gradiente de aspectos histológicos demonstrando a evolução da lesão de adenoma para tumor *borderline* para carcinoma dentro do mesmo tumor é frequente, corroborando a hipótese de progressão de tumores *borderline* para carcinoma. (Yasunaga et al. 2009).

Na análise por imuno-histoquímica, os tumores *borderline* mucinosos são caracterizados pela ausência da expressão de WT1, RE e RP. Estes tumores podem expressar PAX8 e HER2 assim como os carcinomas mucinosos (Yasunaga et al. 2009). Um estudo recente demonstrou mudança na expressão das mucinas (principalmente 2 e 6) conforme ocorre a progressão da lesão de adenoma para *borderline* para carcinoma (El-Bahrawy et al. 2015). Estudos em genômica têm demonstrado que a alteração mais frequente é aquela relacionada ao gene KRAS (Mackenzie et al. 2015). Em contrapartida, a antiga variante *borderline* mucinoso *mülleriano*, atualmente reconhecida como tumor *borderline* seromucinoso expressa RE e RP. Sua patogênese está provavelmente vinculada à endometriose, assim pode atuar como lesão precursora do carcinoma endometrióide de baixo grau, conforme sugerido por Yasunaga e cols. (2009).

1.3. Risco de progressão de lesões precursoras (*borderline*) para carcinoma: o estudo da expressão de marcadores proteicos

Com o intuito de definir o risco de progressão de lesões *borderline* para carcinoma, vários marcadores proteicos vêm sendo atualmente estudados.

São eles:

1) marcadores proteicos associados à transcrição com função ora de ativação ora de repressão no processo de diferenciação epiteliomesenquimal ou mesenquimoepitelial (Shen et al.2017).

2) marcadores proteicos relacionados à transcrição de genes (Shen et al. 2017), que atuam na divisão celular e como supressores tumorais.

3) marcadores proteicos associados à proliferação celular e apoptose (Naik et al. 2015).

4) marcadores proteicos associados aos processos de neoangiogênese (Liang et al. 2015; Premalata et al. 2016).

Nesta tese, em consonância com o estudo já previamente desenvolvido pela autora com carcinomas de ovário (de Toledo et al. 2014) serão examinados por imuno-histoquímica os seguintes marcadores proteicos: RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona) e *Human Epidermal Growth factor Receptor 2* (HER2). De acordo com a literatura sobre o tema,

optamos por acrescentar o marcador *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), pois há recentes trabalhos sugerindo o uso de *Bevacizumab* para carcinoma seroso de baixo grau recorrente (Komatsu et al. 2017).

1.3.1. Receptores hormonais

O ovário expressa receptores de estrógeno e progesterona, sendo que a presença destes diferencia o mesotélio do peritônio (Chang et al. 1996; Shimizu et al. 2000). A ação do estrógeno é mediada por dois receptores de estrógeno (pertencentes à superfamília de receptores nucleares), alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$), que através da regulação sobre a transcrição de genes têm efeitos contrários no crescimento das células do câncer de ovário (Lazennec, 2006). Alguns trabalhos sugerem que o $RE\beta$ atua bloqueando o efeito de proliferação celular do $RE\alpha$ (Haring et al. 2012; Cunat et al. 2004). Entretanto, outros trabalhos que avaliaram a expressão de $RE\beta$ por mRNA demonstraram que a variante $Re\beta5$ é frequentemente expressa no câncer de ovário com efeito proliferativo semelhante ao $RE\alpha$ (Suzuki et al. 2008); assim como a transição da expressão do $RE\beta$ do núcleo para o citoplasma acarretaria em perda de sua função antagônica ao $RE\alpha$ e consequentemente pior evolução clínica (De Stefano et al. 2011).

Já o receptor de progesterona (RP) (membro também da superfamília de receptores nucleares) está subdividido em subtipos A e B estruturalmente

semelhantes, porém com atividades complementares. O subtipo A teria efeito supressor sobre o receptor de estrógeno enquanto que o subtipo B seria um potente estimulador na expressão de genes dependentes da progesterona (Akahira et al. 2002; Modugno, 2004).

Os mecanismos pelos quais estrógeno e progesterona interagem na expressão clínica do câncer de ovário ainda não são completamente compreendidos. Modelos experimentais tais como o de Langdon (Langdon et al. 1998) demonstraram um efeito regulatório do estrógeno sobre a progesterona. A hipótese mais aceita é que o estrógeno – principalmente aquele presente nos folículos ovulatórios – teria efeitos genotóxico e mitogênico nas células superficiais do ovário. Em contrapartida, dados epidemiológicos sugerem que o estado de alta concentração de progesterona teria um efeito protetor por induzir apoptose.

1.3.2. *Human Epidermal Growth Factor receptor 2 (HER2)*

O *Human Epidermal Growth Factor receptor 2 (HER2)* é um receptor do fator de crescimento relacionado à atividade da tirosina quinase codificado pelo protooncogene erbB-2 e encontrado no cromossomo 17q11. Ele faz parte de uma família de receptores que incluem HER1 (EGFR), HER3 e HER4. O HER2, assim como os demais, é um receptor transmembrânico e sua ativação inicia uma cascata intracelular que regula o

crescimento, a diferenciação, a mobilidade, a adesão e a apoptose celular (Yeon et al. 2005). Diversos estudos têm demonstrado um papel central da expressão do receptor HER2 na carcinogênese (Lin et al. 2011).

Recentemente alguns estudos avançaram o entendimento no papel da cadeia de quinases RAS – RAF – MEK – ERK – MAP na carcinogênese. BRAS e KRAS são proteínas dessa cadeia cujas mutações levam à ativação de fatores de proliferação celular. Acredita-se que a maioria dos tumores *borderline* mucinosos apresentem KRAS mutado enquanto a mutação BRAF seja mais presente nos tumores *borderline* serosos (Mayr et al. 2006). Essas mutações se mantêm nos carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos e os estudos para completo entendimento dessas vias de sinalização encontram-se em curso. A compreensão adequada destes mecanismos poderá levar às novas linhas terapêuticas (Kaldawy et al. 2016). No câncer de mama é conhecido o fato de que ativação do BRAF desencadeia mecanismos de resistência ao uso de linhas terapêuticas que tenham como alvo o HER2 através da ativação da via de sinalização das MAPK/ ERK quinases (Taveira et al. 2017).

1.3.3. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF): fator de crescimento endotelial vascular

O *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), fator de crescimento endotelial vascular, é um fator mediador da angiogênese promovendo o recrutamento e a proliferação de células endoteliais e seus precursores dentro do tumor tendo papel crucial durante seu desenvolvimento. Tanto o VEGF sérico quanto o estudo da sua expressão nas células tumorais são importantes. Liang e cols. (2015) fizeram uma revisão a respeito do papel do VEGF sérico no câncer de ovário e concluíram que o mesmo apresenta uma acurácia moderada para o diagnóstico de carcinoma de ovário, porém que mais estudos são necessários (Liang et al. 2015). Quanto ao papel da expressão do VEGF nos tecidos tumorais, há diversos estudos que demonstram que tumores que expressam VEGF apresentam pior prognóstico (Loizzi et al. 2017). Por sua vez, o uso de um inibidor desta molécula (o *Bevacizumab*) já foi aprovado para o uso em câncer de ovário primário ou recorrente (Hui et al. 2015).

1.4. Justificativa

Existe uma falta de consenso relacionada à origem dos tumores *borderline*, o que interfere na extensão do seu tratamento. A diferenciação destas lesões e a avaliação do risco de progressão para câncer são

necessárias para o estabelecimento de uma conduta adequada. Muito dessa definição de risco se baseia em características histopatológicas como a presença de implantes invasivos ou carcinoma intraepitelial que podem não estar presentes na primeira cirurgia. Não há, atualmente, marcadores de risco bem estabelecidos de evolução para carcinoma com expressão imuno-histoquímica. Com o estudo das expressões dos marcadores imuno-histoquímicos pretende-se avaliar se existe um padrão de risco e de progressão de adenoma para tumor *borderline* para carcinoma o que é definido como gradiente de evolução.

Nesta tese, considerando o expressivo número de mulheres com tumores *borderline* e carcinomas de ovário operadas e com seguimento no Hospital da Mulher Prof. Dr. J. A. Pinotti, CAISM/Unicamp (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher/ Universidade Estadual de Campinas), realizamos uma análise dos potenciais padrões histopatológicos e marcadores proteicos que diferenciem mulheres com maior risco de progressão para carcinoma e avaliamos a presença de vias de sinalização celular passíveis de abordagem terapêutica. A análise das características histopatológicas e padrões de expressões de marcadores proteicos podem contribuir para a identificação de quais grupos de lesões *borderline* apresentariam maior risco de evolução para carcinoma, e quais carcinomas

se beneficiariam do uso de terapia alvo para os marcadores proteicos estudados.

2.Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Analizar a presença de padrões histopatológicos nos tumores *borderline* serosos/seromucinosos e mucinosos, e, os padrões de expressões dos marcadores imuno-histoquímicos RE/ RP/ HER2/ VEGF entre as áreas de adenoma, *borderline* e carcinoma dentro dos carcinomas serosos de baixo grau e dos carcinomas mucinosos do ovário.

2.2. Objetivos específicos:

Comparar as características clínicas e patológicas com a presença de padrões histopatológicos nos tumores *borderline* serosos/seromucinosos e mucinosos do ovário.

Comparar os padrões de expressões dos marcadores imuno-histoquímicos RE /RP /HER2 / VEGF entre as áreas de adenoma, *borderline* e carcinoma (gradiente de evolução) dentro de cada tumor, nas mulheres diagnosticadas com carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos do ovário.

3. Metodologia

3.1. Desenho

Este foi um estudo de coorte reconstituída retrospectiva.

3.2. Tamanho amostral

Por se tratar de uma coorte de tumores de ovário pouco frequentes, foram incluídos todos os casos ingressos no serviço de Oncologia Pélvica Ginecológica do CAISM/ Unicamp de 1995 a 2015 com o diagnóstico de tumores *borderline* serosos, seromucinosos e mucinosos, e, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos do ovário. Para o cálculo do tamanho amostral levamos em conta a média histórica de tumores epiteliais malignos de ovário de aproximadamente 50 casos por ano, inicialmente tratados no CAISM e com blocos de parafina e prontuários completos. Inicialmente foi estimado que nesse período de 21 anos tivéssemos os dados completos de cerca de 100 tumores *borderline* e 100 carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos do ovário, de acordo com a frequência estimada na literatura. Na nossa casuística encontramos 87 tumores *borderline* e 105 carcinomas. Dentre estes casos, 73 tumores *borderline* e 63 carcinomas foram incluídos de acordo com os critérios de inclusão (totalizando uma perda de 16% nos tumores *borderline* e 40% nos carcinomas).

3.3. Seleção de sujeitos (material ou casuística)

Os sujeitos do estudo foram as mulheres atendidas como caso novo no serviço de Oncologia Ginecológica do CAISM/Unicamp no período entre janeiro de 1995 a dezembro de 2015. Dessas mulheres foram selecionados os prontuários e os respectivos blocos e lâminas. Os prontuários foram separados no SAME (Serviço de Arquivo Médico) do CAISM de acordo com o número de prontuário de cada paciente. As lâminas e os blocos foram levantados junto ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Foram incluídos todos os casos de tumores *borderline* serosos, *borderline* seromucinosos, *borderline* mucinosos, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos primários do ovário que não tenham sido submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia neoadjuvantes, totalizando 192 pacientes (87 tumores *borderline* e 105 carcinomas). Foram excluídos 14 casos nos tumores *borderline* e 42 casos nos carcinomas, nos quais não tivemos confirmação anatomopatológica, ou que as lâminas e os blocos não foram encontrados ou adequadamente fixados e preservados para realização de estudo histopatológico e/ou imuno-histoquímico. Desta forma, totalizamos 73 tumores *borderline* e 63 carcinomas para análise final. Uma vez selecionados os casos, foi feito um levantamento dos prontuários para atualização dos dados (variáveis) e da evolução de cada paciente. Após esta

seleção, os blocos e lâminas foram encaminhados para processamento, análise histopatológica e imuno-histoquímica.

3.4. Variáveis e conceitos

❖ Variáveis clínicas:

- Idade – em anos completos.
- IMC (índice de massa corpórea) – peso (em quilogramas) dividido pela altura (em metros com decimais) ao quadrado.
- Menopausa – foi considerado como sim ou não conforme referido pela paciente se, na data da inclusão no banco de dados, havia cessado os fluxos menstruais há pelo menos um ano. Em caso de histerectomia prévia o dado foi registrado como não disponível.

❖ CA 125: marcador tumoral sérico coletado no dia do primeiro atendimento, considerado como alterado se valor maior ou igual a 35U/ml. Variável contínua coletada conforme relatado no prontuário.

❖ Tipo histológico: dado que classifica os diferentes tipos dos epitélios das neoplasias. Foi fornecido pelo patologista através do exame do material proveniente de biópsia ou peça cirúrgica e foram reclassificados histopatologicamente segundo os critérios estipulados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2014 (Kurman et al.

2014), em *borderline* serosos/seromucinosos, *borderline* mucinosos, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos (nota: apesar do uso da nomenclatura “*tumor proliferativo atípico*” para os tumores *borderline* de acordo com a classificação de 2014 da OMS, foi optado por manter a denominação *borderline* nesta tese em virtude de sua ampla disseminação no meio científico).

- ❖ Estadiamento patológico da neoplasia: foi classificado de acordo com os critérios de estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Zeppernick et al. 2014), através do descritivo da cirurgia e do resultado anatomopatológico fornecido pelo patologista após o exame da peça cirúrgica.
- ❖ Sobrevida livre de doença: intervalo de tempo, medido em anos e seu decimal, calculado entre a data (dia, mês e ano) do primeiro atendimento até a recidiva ou progressão (dia, mês e ano), segundo informações do prontuário médico.
- ❖ Sobrevida global: intervalo de tempo, medido em anos e seu decimal, calculado entre a data (dia, mês e ano) do primeiro atendimento até o último contato com a paciente (dia, mês e ano). O estado da paciente ao último contato será referido como viva ou óbito, segundo informações do prontuário médico.

- ❖ Recorrência (ou recidiva): dado categorizado como sim ou não segundo a presença ou ausência do dado de recidiva da doença respectivamente, conforme anotações de prontuário.
- ❖ Morte (ou óbito): dado categorizado como sim ou não segundo a presença ou ausência do dado de óbito relacionado à doença respectivamente, conforme anotações de prontuário.
- ❖ Características histopatológicas nos tumores *borderline* serosos:
 - Microinvasão: são células eosinofílicas arredondadas, isoladas ou aglomerados de células dentro do estroma, com uma citomorfologia que se assemelha às células epiteliais que revestem a superfície das papilas. Os focos microinvasivos são freqüentemente cercados por espaços de retração e um estroma rico em fibroblastos e não podem exceder 5 mm na maior dimensão linear.
 - Variante micropapilar: é um subtipo distinto de tumor *borderline* seroso na classificação recente da OMS, que inclui 5-15% dos casos. Esta variante foi inicialmente descrita como "carcinoma seroso de baixo grau não invasivo".

- Invasão linfonodal: descrito como qualquer foco de células que se assemelham às células epiteliais do tumor, dentro de qualquer linfonodo que possa ter sido ressecado.
- Implantes: um terço dos tumores *borderline* estão associados a implantes peritoneais. A recente classificação da OMS abandonou a subdivisão anterior de implantes invasivos e não invasivos e agora, eles consideram qualquer foco invasivo como carcinoma seroso de baixo grau peritoneal, com comportamento biológico similar.

❖ Características histopatológicas nos tumores *borderline* mucinosos:

- Microinvasão: são células eosinofílicas arredondadas, isoladas ou aglomerados de células dentro do estroma, com uma citomorfologia que se assemelha às células epiteliais que revestem a superfície das papilas. Os focos microinvasivos são freqüentemente cercados por espaços de retração e um estroma rico em fibroblastos e não podem exceder 5 mm na maior dimensão linear.
- Carcinoma intra-epitelial: caracteriza-se por áreas na superfície das papilas com atipia nuclear de alto grau que diferem citologicamente do epitélio de fundo, geralmente com demarcação acentuada.

- Carcinoma microinvasivo: caracteriza-se por áreas de microinvasão estromal com atipia nuclear de alto grau inferior a 5 mm.
 - Nódulos murais: compreendendo nódulos reativos de sarcoma ou focos de sarcoma franco ou carcinoma anaplásico dentro da parede do cisto, variando amplamente em tamanho (até 10 cm) e número (Hauptman et al. 2017).
- ❖ Expressão de receptores hormonais (RE/RP – receptor de estrógeno/receptor de progesterona): percentual de núcleos corados por imuno-histoquímica. (Marcador nuclear associado à proliferação celular e apoptose respectivamente). Variável categorizada como positiva ou negativa de acordo com a metodologia da análise imuno-histoquímica.
- ❖ Expressão de HER2: percentual de células coradas (Marcador de membrana relacionado à proliferação celular). Variável categorizada como positiva ou negativa de acordo com a metodologia da análise imuno-histoquímica.
- ❖ Expressão de VEGF: percentual de células coradas (marcador celular citoplasmático relacionado aos fatores pró-crescimento endotelial e angiogênese). Variável categorizada como positiva ou negativa de acordo com a metodologia da análise imuno-histoquímica.

❖ Gradiente de expressão para todas as proteínas – variável estabelecida especificamente para esta tese com a seguinte classificação:

- Perda: refere-se à perda de expressão de determinado marcador proteico durante a transição de adenoma para *borderline* ou *bordeline* para carcinoma dentro dos carcinomas estudados.
- Estável negativo: refere-se à estabilidade de ausência de expressão de determinado marcador proteico durante a transição de adenoma para *borderline* ou *bordeline* para carcinoma dentro dos carcinomas estudados.
- Estável positivo: refere-se à estabilidade de presença de expressão de determinado marcador proteico durante a transição de adenoma para *borderline* ou *bordeline* para carcinoma dentro dos carcinomas estudados.
- Ganho: refere-se ao ganho de expressão de determinado marcador proteico durante a transição de adenoma para *borderline* ou *bordeline* para carcinoma dentro dos carcinomas estudados.

3.5. Técnicas, testes e exames

3.5.1. Histologia

O material para avaliação histopatológica do estudo foi proveniente

das peças cirúrgicas obtidas nas cirurgias para tumores de ovário, fixadas em formalina e incluídas em parafina, cujos blocos foram encontrados no departamento de Anatomia Patológica / Faculdade de Ciências Médicas (FCM) / Unicamp. Foram selecionados os blocos de mulheres com diagnóstico de tumores ovarianos *borderline* serosos/seromucinosos, *borderline* mucinosos, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos.

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram revisadas pelo patologista e as lesões foram reclassificadas histopatologicamente segundo os critérios estipulados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 2014 (Kurman et al. 2014). Foi realizada uma avaliação minuciosa dos tumores *borderline* serosos/seromucinosos em: SOE (sem outras especificações) ou quanto à presença ou ausência de microinvasão, padrão micropapilífero, implantes invasivos, implantes não invasivos e/ou implante nodal. Quanto aos tumores *borderline* mucinosos foi feita a avaliação em SOE (sem outras especificações) ou quanto à presença ou ausência de microinvasão, carcinoma intraepitelial, carcinoma microinvasivo e/ou nódulos murais. Nos carcinomas serosos de baixo grau e nos carcinomas mucinosos do ovário, inicialmente foi feita a seleção do bloco com maior representatividade de áreas com adenoma, *borderline* e carcinoma subsequentes através da lâmina de H&E. Após, foram feitas mais 4 lâminas

deste bloco selecionado para estudo imuno-histoquímico de RE, RP, HER2 e VEGF isoladamente.

3.5.2. Preparação do material para estudo imuno-histoquímico

Uma vez selecionados os casos, as lâminas obtidas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes (100, 80, 50%) e lavadas com água destilada corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos, cada um com duração de 3 minutos, em água oxigenada a 10 volumes, seguida de lavagem em água corrente e destilada. Para recuperação antigênica foi utilizada a panela a vapor Pascal DAKO, com o objetivo de “desmascarar” os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 (10mm) à 95°C durante 30 minutos. A seguir, foram resfriadas em temperatura ambiente durante 20 minutos e lavadas em água destilada corrente. Após esta etapa, os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico, nas diluições específicas preconizadas pelo fabricante, à 4°C, “overnight”. Após a incubação, as lâminas foram três vezes lavadas em PBS, sob agitação (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6) e secadas. Como sistema de detecção, as lâminas foram incubadas com Advance TM HRP Detection System (DAKO) a 37°C durante 1 hora e a seguir, submetidas a três lavagens em PBS sob agitação.

Após a incubação, a revelação foi feita com substrato cromogênico DAB (3'-diaminobenzidine, Sigma, código d5637) na proporção de 0,06g para 100 ml em PBS, 500µl de água oxigenada 3% e 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) à 37°C durante 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra coradas com hematoxilina de Harris durante 30 a 60 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizados em três banhos de xilol para, a seguir, terem sido montados em lamínula e resina (Entellan). Controles internos e externos positivos e negativos foram utilizados para validar as reações imuno-histoquímicas.

Foram utilizados os seguintes marcadores: a) receptor de estrógeno: RE, clone 1D5 (DAKO), na diluição de 1:300; b) receptor de progesterona: RP, clone Pgr636 (DAKO), na diluição de 1:300; c) receptor epitelial humano: Cerb2, clone HER2 (DAKO), na diluição de 1:1000; d) receptor do fator de crescimento endotélio vascular: VEGF, clone SP28 (Thermo Scientific), pronto para uso.

3.5.3. Análise da imuno-histoquímica

Um observador único (LBEC), cego às características clínicas e patológicas da doença, avaliou a coloração imuno-histoquímica (IHC) de forma independente. A coloração nuclear foi considerada para RE e RP. A

coloração de membrana foi considerada para HER2. A coloração citoplasmática foi considerada para VEGF. As porcentagens das estruturas coradas RE, RP, HER2 e VEGF foram ainda categorizadas em: (0): negativa, (1): menos de 1% de núcleos corados, (2): 1-10% de núcleos corados, (3): 10-35% de núcleos corados, (4): 35-70% de núcleos corados e (5): > 70% de núcleos corados. A intensidade foi categorizada como 0: negativa, 1: fraco, 2: moderado e 3: forte. O resultado final foi calculado pela adição do escore obtido a partir da intensidade de coloração ao derivado da porcentagem de células positivas, obtendo resultados teóricos variando de 0 a 8. Para fins de análise, foi considerado positivo se a pontuação atingiu quatro (4) ou mais.

3.6. Instrumentos para coleta de dados

Os dados foram anotados em fichas e tabelas que foram especialmente elaborados para o estudo (Anexos 8.1 e 8.2). Após a coleta e realização dos experimentos laboratoriais, os resultados foram anotados nas fichas e tabelas, sendo a seguir digitados em planilha eletrônica tipo Excel®.

3.7. Coleta de dados

A coleta de dados prosseguiu da seguinte forma: foram selecionados todos os casos de tumores de ovário *borderline* serosos/seromucinosos (n=35), *borderline* mucinosos (n=38), carcinomas serosos de baixo grau

(n=29) e carcinomas mucinosos (n=34), atendidos nos ambulatórios de Oncologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher Professor Dr. José Aristodemo Pinotti da Universidade Estadual de Campinas (CAISM – Unicamp) entre 1995 e 2015. Foram selecionados apenas os casos que tivessem amostras histológicas de tecido tumoral (arquivado em parafina) no laboratório de Anatomia Patológica da Unicamp, passíveis de serem recuperadas para estudo histopatológico e imuno-histoquímico. As patologistas Profa. Dra. Liliana A. Lucci de Angelo Andrade e Profa. Dra. Larissa Bastos Eloy da Costa junto com a autora desta tese selecionaram as áreas representativas de tecido tumoral para confecção de novas lâminas para avaliação histopatológica e estudo imuno-histoquímico, nos blocos de parafina armazenados.

3.8. Processamento e análise dos dados

Os dados adquiridos e anotados na ficha de coleta de dados e nas tabelas de características histopatológicas e imuno-histoquímicas foram transferidos para planilhas eletrônicas tipo Excel® for Windows®. Os dados foram analisados através do pacote estatístico R para microcomputadores. O nível de significância assumido foi de 5% ($p \leq 0,05$ e intervalos de confiança de 95%). Para o artigo 1, obtivemos 73 pacientes com tumores *borderline* com acompanhamento completo e um período médio de seguimento de 57,6

meses (min = 1,3 meses, 25% = 19,3 meses, 75% = 83,8 meses, max = 282,1 meses). Comparamos as principais características clínicas e histopatológicas das mulheres e seus tumores em relação à presença de microinvasão, utilizando testes de Fisher de qui-quadrado, testes de Kruskal-Wallis e Student, conforme a natureza das variáveis estudadas. Finalmente, determinamos o ponto de corte ideal para os níveis de CA125 para prever a microinvasão usando a análise da curva de características do operador receptor (ROC).

Para o artigo 2, obtivemos 63 pacientes sendo 29 mulheres com carcinomas serosos de baixo grau e 34 mulheres com carcinomas mucinosos do ovário. Primeiro, calculamos a proporção de amostras positivas para cada marcador nos componentes de adenoma, *borderline* e carcinoma das lesões do ovário. Utilizamos o Qui-quadrado para tendências para avaliar se havia um vetor direcional de aumento/ diminuição da proporção de amostras positivas na transição de adenoma para *borderline* para carcinoma, e, o teste T de Fisher foi utilizado para comparar as características clínicas das mulheres em relação à expressão dos hormônios esteróides (RE e RP), HER2 e VEGF. Em seguida, utilizamos o teste de McNemar ou o teste de Kruskal-Wallis, conforme a natureza da variável estudada, para avaliar a associação entre os resultados dos marcadores (perda, estável negativo/estável positivo, ganho) e características clínicas e patológicas dos tumores e das mulheres.

3.9. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Pesquisa da Unicamp CAAE nº 84991518.0.0000.5404 (Anexo 8.3). Foram respeitados os princípios da declaração de Helsinque (World Medical Association, 2000), da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 1996) e da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 2012) que orientam a pesquisa médica envolvendo seres humanos incluindo estudos de material humano. Os blocos de parafina, de onde foram obtidas as lâminas, foram identificados pelo número de biópsia. Com a finalidade de manter em sigilo a identidade das mulheres, as lâminas obtidas de cada bloco receberam um número diferente que correspondeu ao estudo. Também, os dados do prontuário médico que foram utilizados para selecionar os blocos pelos critérios de inclusão e exclusão foram mantidos em sigilo.

As análises realizadas neste estudo não implicaram em mudança da terapêutica e não foram realizadas coletas de material adicional. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos às mulheres, já que toda pesquisa foi realizada em material biológico que foi retirado previamente por necessidade de tratamento. Não foi obtido o consentimento informado das mulheres das quais foi retirado cada um dos tumores por se tratar de um estudo realizado exclusivamente com blocos de parafina. Não foi necessário solicitar novas informações das mulheres. Portanto, desta forma, a dispensa

da aplicação do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) foi solicitado à Comissão de Pesquisa.

3.10.Financiamento

Os materiais adquiridos foram principalmente materiais de laboratório para as reações de extração, parafinização e reações imuno-histoquímicas. Os instrumentais permanentes utilizados já são parte do arsenal tecnológico do laboratório de Anatomia Patológica, portanto não foram necessárias novas aquisições deste tipo. Os materiais de escritório se restringiram ao material de cartucho de tintas e folhas para impressão, assim foi feito uso do material de informática já existente no parque tecnológico do CAISM. Os reagentes para imuno-histoquímica foram adquiridos com verba do projeto FAPESP nº 0782-4/2016.

4.Resultados

Com os resultados obtidos foram produzidos dois artigos, cada um correspondente a um objetivo específico.

4.1. Artigo 1

Increased CA125 levels and serous/seromucinous histological subtype are associated with microinvasion in women with borderline ovarian tumors.

4.2. Artigo 2

Human Epidermal factor Receptor 2 (HER2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Steroid Receptor expression gradient in the benign-borderline-carcinoma transition of low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinomas.

4.1. Artigo 1

Increased CA125 levels and serous/seromucinous histological subtype are associated with microinvasion in women with borderline ovarian tumors

Authors:

Maria Carolina Szymanski de Toledo¹, MD*

Sophie FM Derchain¹, MD, PhD.

Liliana A. Lucci de Angelo Andrade², MD, PhD.

Larissa Bastos Eloy da Costa², MD, PhD.

Amilcar Barreta¹, MD, PhD.

Amanda Canato Ferracini³, MsC.

Luís Felipe Sallum¹, MD, PhD.

Luis Otavio Sarian¹, MD, PhD. *

1. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, State University of Campinas – Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

2. Department of Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas – Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

3. Laboratory of Experimental Pathology, CAISM– Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Address for correspondence:

Maria Carolina Szymanski de Toledo

Email: carolunicamp38@yahoo.com.br

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, PO Box 6111 State University of Campinas – UNICAMP, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Phone 0 55 19 35219305/ Fax 0 55 35219516

Luis Otávio Sarian

Email: sarian@unicamp.br

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, PO Box 6111 State University of Campinas – UNICAMP, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Phone 0 55 19 35219305/ Fax 0 55 35219516

Acknowledgements

This study was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (nº 0782-4/2016)

Abstract

Objectives: To determine clinical and pathological factors associated with microinvasion in serous/seromucinous and mucinous borderline ovarian tumors (BOTs). **Methods:** 73 women with serous/seromucinous or mucinous BOTs were selected for this study. Follow-up (FU) data ranging from 1995 to 2015 were retrieved (mean FU= 57.6 (1.3–282.1 months), and recurrence/death events were logged. Two experienced pathologists, following the most recent pathological criteria, scrutinized the key pathological features of the tumors: for serous/seromucinous BOTs, tumor microinvasion, micropapillary pattern, presence of invasive implants, presence of noninvasive implants and lymph-node invasion were described; for mucinous BOTs, tumor microinvasion, presence of intraepithelial carcinoma and microinvasive carcinoma were also determined. We then determined whether clinical features and the histopathological characteristics of the tumors were associated with microinvasion. **Results:** Fifty-two percent of the patients had mucinous BOTs, followed by serous/seromucinous (48%). Patients in whom microinvasion was detected had higher CA125 levels (172.6 ± 255.9 U/mL vs. 78.6 ± 114.5 U/mL; $p=0.04$). For patients with microinvasion, the serous/seromucinous subtypes were more prevalent than in those without microinvasion (65.4% vs. 38.2%; $p=0.02$). None of the other histopathological features was associated with microinvasion. **Conclusions:** Our data showed that BOTs microinvasion was positively associated with CA125 levels and serous/seromucinous subtype. In addition, we have studied a panel of other histopathological features, but none of the characteristics portrayed in that panel was associated with BOTs microinvasion. Due to a small number of relapses, and in spite of the relatively large observation time, we failed to evaluate whether microinvasion is a harbinger of recurrence in women with BOTs.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Keywords: borderline ovarian tumor (BOT), microinvasion, CA125

Introduction

Taylor (Taylor, 1929) first described borderline ovarian tumors (BOTs) in 1929 (Gershenson et al. 2016). BOTs are ovarian tumors chiefly characterized by marked nuclear atypia and more proliferative pattern than its benign counterparts are. However, stromal invasion more than 5 mm must be absent to comply with current BOT definitions (Seidman et al. 2002). The most frequent subtypes are serous and mucinous BOTs, also called atypical proliferative tumors since the last 2014 World Health Organization (WHO) classification.

Even before the 2014 classification, controversy surrounding the clinical aspects and terminology definitions for BOTs has been a hallmark in the literature about these tumors. Criteria to define some histologic patterns of BOTs were loosely established and caused substantial disagreements between pathologists (Hauptman et al. 2017). Since recurrence and deaths related to BOTs are relatively rare events, most studies attempting to determine the associations of BOT features with its oncological outcomes are mostly plagued by inconsistencies in histological BOT classifications. In addition, most studies on the subject suffer from sample sizes insufficient to draw solid conclusions (Silva et al. 2006; Vasconcelos et al. 2016).

The WHO group responsible for the 2014 classification made a major effort to establish straightforward, reproducible and comprehensive criteria to define microinvasion, non-invasive low grade serous cancer (serous BOT with micropapillary pattern), noninvasive epithelial implants and noninvasive desmoplastic implants, as well as microinvasion, intraepithelial carcinoma and microinvasive carcinoma in mucinous BOT (Kurman et al. 2014). Microinvasion is the only histopathological feature described in both serous and mucinous tumors. In the clinical practice, microinvasion often brings

doubts about the extent of the surgical procedure for BOT and how should patients be followed-up after treatment. For instance, it remains controversial whether fertility sparing surgery and/or omitting lymphadenectomy is safe in patients with BOTs accompanied by microinvasion (Chen et al. 2016; Decker et al. 2017; Helpman et al. 2015). Following 2014 WHO classification, microinvasion is defined as “isolated rounded eosinophilic cells or cell clusters within the stroma, with a cytomorphology resembling the epithelial cells lining the surface of the papillae”, which cannot exceed 5mm (Hauptman et al. 2017). Moreover, for mucinous borderline tumors when these cells resemble mucinous carcinoma in their nuclear atypia even less than 5 mm in the greatest dimension, these foci are classified as “microinvasive carcinoma” (Kurman et al. 2014).

BOT is a controversial entity since its description in 1929 by Taylor (Taylor, 1929; Seong et al. 2015). The discrepancies about these tumors remains in pathological classification and therapeutic methods considering that about 98% of them have a good prognosis; however, in some series, advanced stages with extraovarian implants and/or invasive implants can behave as its malignant counterpart. One of the most obscure BOT factors in terms of its clinical/pathological implications and/or associations is microinvasion. It remains highly controversial whether microinvasion bears a prognostic significance to women with BOTs, and therefore its diagnosis should prompt further therapy or more intensive follow-up protocols (Maniar et al. 2014). Recently, Boyraz and cols. (2017) have shown in a multicenter case-control study of 902 women that patients with microinvasive BOTs have higher rates of recurrence (17.4% vs 7.8%, $p = 0.03$).

It is important to establish clinical and pathological findings associated with the current definition of microinvasion in BOTs, since this feature can be a proxy for several factors associated with tumor aggressiveness and, if further studies are able to

demonstrate, disease prognosis. In this study, we evaluated the association of microinvasion with the clinical characteristics, histopathological features of BOTs and oncological outcomes of these women, now fully reclassified according to the 2014 WHO classification.

Subjects and methods

Patient selection

This was a retrospective cohort study. The Institutional Review Board (IRB) of the State University of Campinas (Unicamp) approved this study. A total of 73 Brazilian women with BOTs (38 mucinous borderline tumors and 35 serous/seromucinous borderline tumors) who had attended our gynecologic oncology clinics between 1995 and 2015, followed up until February 2017, and had paraffin-confirmed diagnoses were included for analysis. We assessed patient medical records to collect key clinical and epidemiological data. Surgeries were performed as defined by International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging for borderline ovarian tumors (Zeppernick et al. 2014). In addition, biopsies were examined by histopathology and disease stage was determined according to the WHO criteria, Gynecologic Oncology Group criteria, and the FIGO systems (Meinhold-Heerlein et al. 2016).

Specimens

Tumor samples were obtained at the laparotomy before any other treatment. Slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) were made from the original paraffin blocks

that were analyzed for the selection of BOTs. Then, two experienced pathologists (LALA and LBEC) analyzed these specimens.

Morphological features

Pathologists used the 2014 WHO classification of BOTs and their histopathological features (Kurman et al. 2014). In brief, they gave special attention for the following histological characteristics of the BOTs (figure 1):

1) Serous borderline tumors (SBT):

- Microinvasion in SBT: is limited to isolated rounded eosinophilic cells or cell clusters within the stroma, with a cytomorphology resembling the epithelial cells lining the surface of the papillae. Microinvasive foci are often surrounded by retraction spaces and a stroma rich in fibroblasts and cannot exceed 5 mm in the largest linear dimension (figure 1 – E).
- SBT —micropapillary variant: is a distinct subtype of SBT in the recent WHO classification, comprising 5–15% of SBT. This SBT variant was initially described as “non-invasive low-grade serous carcinoma” (non-invasive LGSC) (figure 1 – A).
- Implants of SBT: one third of SBTs are associated with peritoneal implants. The recent WHO classification abandoned the prior subdivision of noninvasive and invasive implants and now, they consider any invasive foci as peritoneal LGSC reflecting its similar biologic behavior (figure 1 – C and D).
- Lymph node invasion: described as any foci of cells resembling tumor epithelial cells inside any lymph node that may be resected.

2) Mucinous borderline tumor (MBT):

- Microinvasion MBT: is stromal invasion measuring less than 5 mm in the greatest linear dimension and consisting of single cells, clusters, or small foci of confluent glandular or cribriform growth, regardless of the number of microinvasive foci (figure 1 – F).
- Intraepithelial carcinoma MBT: is characterized by areas with high-grade nuclear atypia that differ cytologically from the background epithelium, usually with sharp demarcation (figure 1 – G).
- Microinvasive carcinoma: is characterized by areas of stromal invasion with high-grade nuclear atypia less than 5 mm (figure 1 – H).
- Mural nodules in MBT: comprising either reactive sarcoma-like nodules or foci of frank sarcoma or anaplastic carcinoma within the cyst wall, varying widely in size (up to 10 cm) and number (Hauptman et al. 2017).

Statistical analysis

All statistical calculations were performed with the R environment for statistical computing (R Core Team). Confidence levels were set to 5%. We obtained 73 patients with complete follow-up and a mean follow-up period of 57.6 months (min= 1.3 month, 25%= 19.3 months, 75%= 83.8 months, max= 282.1 months). We compared the key clinical and histopathological features of the women and their tumors as related to the presence of microinvasion, using chi-squares Fisher's tests, Kruskal-Wallis and Student's T tests. Finally, we determined the optimal cutoff point for CA125 levels to predict microinvasion using receiver operator characteristics (ROC) curve analysis.

Results

For this study, the main clinical and pathological features of 73 women with BOT were recorded. Table 1 shows if these features are related to microinvasion presence. Patients in whom microinvasion was detected had higher CA125 levels (172.6 ± 255.9 U/mL vs. 78.6 ± 114.5 U/mL; $p= 0.04$) than their counterparts with no microinvasion. In addition, in patients with microinvasion, the serous/seromucinous subtypes were more prevalent than in those without microinvasion (65.4% vs. 38.2%; $p=0.02$). Age, body mass index (BMI), menopausal status, disease stage and the number of recurrences did not differ significantly as related to microinvasion presence. Further receiver operator characteristics (ROC) curve analysis showed that the optimal cutoff point for CA125 levels to predict microinvasion was 37.3U/ml, with a sensitivity of 56.5% and a specificity of 76.9%.

In table 2, microinvasion presence was analyzed associated to other histopathological features of serous BOT, such as micropapillary pattern, presence of invasive implants or noninvasive implants and presence of linfonodal invasion. None of these features was related to microinvasion presence. Additional analyses (not shown in table) showed that all recurrences (2 cases) occurred in women with noninvasive implants, but this association was not statistically significant.

Table 3 displays the histopathological features of the mucinous BOT as related to microinvasion. We studied the presence of intraepithelial carcinoma and microinvasive carcinoma. None of these features was associated with microinvasion. We have no cases with mural nodules.

Discussion

In this study, using the most recent WHO histopathological classification of BOTs, we searched for clinical and pathological factors potentially associated with tumor microinvasion. We also used our clinical observation data to evaluate whether microinvasion was associated with BOT recurrence. Our data showed that BOT microinvasion was positively associated with CA125 levels and serous/seromucinous subtype. In addition, we have studied a panel of other histologic features, but none of the characteristics portrayed in that panel was associated with BOT microinvasion. Due to a small number of relapses, and in spite of the relatively large observation time, we failed to evaluate whether microinvasion is a harbinger of recurrence in women with BOT.

Many recent studies examined the association of several histopathological features of BOTs with disease behavior. In a Danish study published this year, Hannibal and cols. (2017), in a group over 1000 women, found that rate of recurrence was significantly higher over 10 years for atypical proliferative serous tumors (APSTs – usual serous borderline tumor) and over 20 years for noninvasive low grade serous cancer (LGSC) – serous borderline tumor with micropapillary pattern. They also demonstrated that women with noninvasive LGSC are significantly more likely to develop serous carcinoma than women with APSTs. This risk is not all explained by invasive implants (Hannibal et al. 2017). This issue – implants in BOT – is a key point to understand the mechanisms of recurrence in BOT as show by Srinivasamurthy (2017) and Silva (2006). In a large study, Vang and cols. (2017) demonstrated that, invasive implants are the most important feature in predicting adverse outcome as it behaves as low-grade serous carcinoma. Besides, classifying tumors as APSTs or noninvasive LGSC predicts the risk for invasive implants and consequently the risk for carcinoma development in serous BOT stage I cases (Srinivasamurthy et al. 2017; Silva et al. 2006; Vang et al. 2017).

It seems to us that serous and mucinous BOTs are separate entities and should be studied individually. For women with mucinous BOT, a large study of 171 cases in 2011 found that women with BOT > stage IC, intraepithelial carcinoma (IECA), microinvasion and age less than 45 were features associated to recurrence (Khunamornpong et al. 2011). In 2014, Maniar and cols., with a histopathological and immunohistochemical analysis of 37 cases, found that cells in microinvasion and lymph node involvement are actually caused by senescent cells, which may help explain why they lack an impact on oncological outcomes. A review article done by Seidman and cols. (2000) supports these findings (Seidman et al. 2000).

In our study, microinvasion was significantly associated with higher CA125 levels and serous/seromucinous type. All though, Khunamornpong and cols. (2011) suggested that microinvasion is an important harbinger of worse prognosis in women with mucinous BOTs, our study did not replicate those findings, since the number of recurrences was low in women with either mucinous or serous BOT (Khunamornpong et al. 2011). More recently, this lack of prognostic significance for microinvasion and micropapillary pattern in predicting recurrence was also demonstrated by Avril and cols. (2012) in a group of 81 patients, a sample similar in size to our data (Avril et al. 2012). Elevated CA125 levels, on the other hand, are associated with disease extent in women with ovarian cancer, and the finding of higher CA125 levels in women with microinvasion may indicate that tumors displaying microinvasion are more actively affecting the celomic epithelium than those that do not display the feature. It is worth noting that our study is, to our knowledge, the first to record an association between higher CA125 levels and presence of microinvasion in women with BOTs. Recently, Song and cols. (2017) examined the association between CA125 levels and borderline tumors and found no relationship (Song et al. 2017).

In essence, our study is an analysis of the association of microinvasion with the most prominent pathological and clinical features in women with BOT. It shares with most studies in the field the weak point of a limited sample size, which hampers the survival analysis related to BOT recurrence. However, the study shows for the first time an association between CA125 levels and microinvasion, an intriguing finding that prompts further analysis on the pathological effects of this feature. In addition, a higher prevalence of microinvasion in women with serous/seromucinous tumors denotes the presumed higher aggressiveness of such tumors.

References

1. Avril S, Hahn E, Specht K, Hauptmann S, Höss C, Kiechle M et al. Histopathologic features of ovarian *borderline* tumors are not predictive of clinical outcome. *Gyn Oncol*. 2012; 127(3):516-24.
2. Boyraz G, Salman MC, Gultekin M, Ozkan NT, Uckan HH, Gungorduk K et al. What is the impact of stromal microinvasion on oncologic outcomes in *borderline* ovarian tumors? A multicenter case-control study. *Arch Gyn Obst*. 2017; 296(5): 979-987.
3. Chen R, Li J, Zhu T, Yu H, Lu X. Fertility sparing surgery for young patients with *borderline* ovarian tumors (BOTs): single institution experience. *J Ovarian Res*. 2016; 9:16. doi: 10.1186/s13048-016-0226-y.
4. Decker KD, Speth S, Brugge HG, Bart J, Massuger LFAG, Kleppe M et al. Staging procedures in patients with mucinous *borderline* tumors of the ovary do not reveal peritoneal or omental disease. *Gynecol Oncol*. 2017; 144 (2): 285-89.
5. Gershenson DM. Management of *borderline* ovarian tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016; 41: 49-59.
6. Hauptman S, Friedrich K, Redline R, Avril S. Ovarian *borderline* tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch*. 2017; 470 (2): 125-42.
7. Helpman L, Beiner ME, Aviel-Ronen S, Perri T, Hogen L, Jakobson-Setton A et al. Safety of ovary conservation and fertility preservation in advanced *borderline* ovarian tumors. *Fertil Steril*. 2015; 104 (1): 138-44.

8. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Siriaunkgul S. Mucinous tumor of low malignant potential (*borderline* or "atypical proliferative" tumor) of the ovary: a study of 171 cases with the assessment of intraepithelial carcinoma and microinvasion. *Int J Gyn Pathol*. 2011; 30(3): 218-30.
9. Kurman, RJ, Carcangiu MI, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs. No 6 in IARC WHO Classification of Tumors, fourth ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon; 2014.
10. Maniar KP, Wang Y, Visvanathan K, Shih IM, Kurman RJ. Evaluation of microinvasion and Lymph Node Involvement in Ovarian Serous *Borderline/* Atypical Proliferative Serous Tumors. A morphologic and Immunohistochemical Analysis of 37 cases. *Am J Sur Pathol*. 2014; 38 (6): 743-55.
11. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gyn Obst*. 2016; 293(4):695-700.
12. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (<http://www.R-project.org/>).
13. Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian serous *borderline* tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Human Pathol*. 2000; 31 (5): 539-57.
14. Seidman JD, Ronnett BM, Kurman RJ. Pathology of *borderline* (low malignant potential) ovarian tumors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002; 16 (4): 499-512.

15. Seong SJ, Kim DH, Kim MK, Song T. Controversies in *borderline* ovarian tumors. J Gynecol Oncol. 2015; 26 (4): 343-9.
16. Silva EG, Gershenson DM, Malpica A, Deavers M. The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous *borderline* neoplasms with noninvasive implants is time dependent. Am J Surg Pathol. 2006; 30 (11): 1367-71.
17. Song T, Lee DH, Jung YW, Yun BS, Seong SJ, Choi CH et al. Elevated Preoperative CA125 or CA19-9 in *Borderline* Ovarian Tumors: Could It Be Suggestive of Advanced Stage or a Poor Prognosis? Gyn Obst Invest. 2017; doi: 10.1159/000475817.
18. Srinivasamurthy BC, Kulandai Velu AR, Krishnan N, Patil AS. Ovarian serous *borderline* tumors with noninvasive and invasive peritoneal implants: A case report each. J Cancer Res Ther. 2015; 11(3): 646. doi: 10.4103/0973-1482.147707.
19. Taylor HC Jr. Malignant and semimalignant tumors of the ovary. Surg Gynecol Obstet 1929; 48:204-30.
20. Vang R, Hannibal CG, Junge J, Frederiksen K, Kjaer SK, Kurman RJ. Long-term Behavior of Serous *Borderline* Tumors Subdivided into Atypical Proliferative Tumors and Noninvasive Low-grade Carcinomas: A Population-based Clinicopathologic Study of 942 Cases. Am J Surg Pathol. 2017; 41(6): 725-37.

21. Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch Gyn Obst.* 2014; 290 (5): 839-42.
22. Vasconcelos I, Darb-Esfahani S, Sehouli J. Serous and mucinous borderline ovarian tumors: differences in clinical presentation, high-risk histopathological features and lethal recurrence rates. *BJOG.* 2016; 123 (4): 498-508.

Table 1. Clinical characteristics of borderline ovarian tumors and microinvasion (n=73)

Characteristic	Microinvasion		
	Yes (n=26)	No (n=47)	p-value
Age (year) (mean, sd)	41.1 (11.7)	43.8 (16.9)	0.66†
BMI (Kg/m ²) (mean,sd)	26 (28.6, 4.9)	45 (26.9, 5.3) *	0.10†
Menopause			
No	17 (70.8%)*	27 (57.4%)	0.4¥
Yes	7 (29.2%)	20 (42.6%)	
CA125 in U/ml (mean, sd)	172.6 (255.9)	78.6 (114.5) NA=1	0.04 †
Stage			
I	21 (80.8%)	42 (89.4%)	0.09¥
II	0 (0.0%)	3 (6.4%)	
III	5 (19.2%)	2 (4.3%)	
Histological Type			
Serous/ seromucinous	17 (65.4%)	18 (38.3%)	0.02 ¥
Mucinous	9 (34.6%)	29 (61.7%)	
Recurrence			
No	25 (96.2%)	45 (95.7%)	1¥
Yes	1 (3.8%)	2 (4.3%)	

†Kruskall-Wallis; ¥Chi-squares of Fisher where appropriate

*NA = data not available of two (2) cases

Table 2. Histopathological features of serous/seromucinous borderline ovarian tumors as related to microinvasion (n=35)

Characteristic	Microinvasion		
	Yes (17)	No (18)	p-value ¥
Micropapillary pattern			
No	16 (94.1%)	17 (94.4%)	1
Yes	1 (5.9%)	1 (5.6%)	
Invasive implants			
No	17 (100%)	17 (94.4%)	1
Yes	0 (0.0%)	1 (5.6%)	
Noninvasive implants			
No	13 (76.5%)	11 (61.1%)	0.47
Yes	4 (23.5%)	7 (38.9%)	
Lymph node invasion			
No	14 (82.4%)	18 (100%)	0.10
Yes	3 (17.6%)	0 (0.0%)	

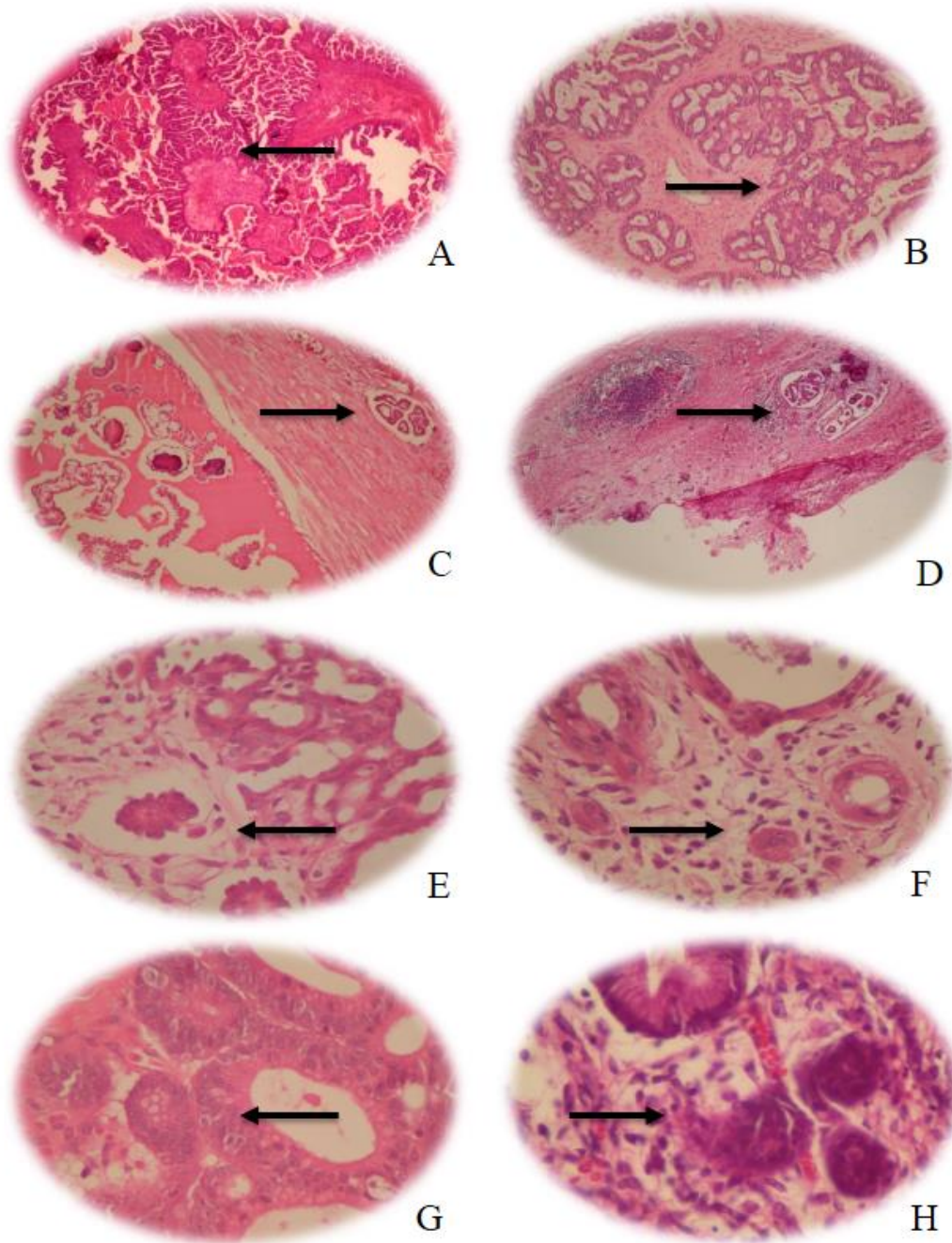
¥ Chi-squares of Fisher where appropriate

Table 3. Histopathological features of mucinous borderline ovarian tumors as related to microinvasion (n=38)

Characteristic	Microinvasion		
	Yes	No	p-value ¥
Intraepithelial carcinoma			
No	8 (88.9%)	26 (89.7%)	1
Yes	1 (11.1%)	3 (10.3%)	
Microinvasive carcinoma			
No	8 (88.9%)	29 (100%)	1
Yes	1 (11.1%)	0 (0.0%)	

¥ Chi-squares of Fisher where appropriate

Figure 1. Histopathological patterns in serous and mucinous borderline tumors



- A) Micropapillary pattern of serous borderline ovarian tumor (10X).
 B) Cribiform pattern of serous borderline ovarian tumors.
 C) Non invasive implants of serous borderline ovarian tumors on ovarian surface.
 D) Non invasive implants of serous borderline ovarian tumors on peritoneal surface.
 E) Area of microinvasion of serous borderline ovarian tumors.
 F) Area of microinvasion of mucinous borderline ovarian tumors.
 G) Mucinous borderline tumor with intraepithelial carcinoma.
 H) Mucinous borderline tumor with microinvasive carcinoma.

Note: the arrow indicates the described areas

4.2.Artigo 2

Human Epidermal factor Receptor 2 (HER2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Steroid Receptor expression gradient in the benign-borderline-carcinoma transition of low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinomas

Authors:

Maria Carolina Szymanski de Toledo¹, MD.*

Sophie FM Derchain¹, MD, PhD.

Liliana A. Lucci de Angelo Andrade², MD, PhD.

Larissa Bastos Eloy da Costa², MD, PhD.

Amilcar Barreta¹, MD, PhD.

Amanda Canato Ferracini³, MD, PhD.

Luís Felipe Sallum¹, MD, PhD.

Luis Otavio Sarian¹, MD, PhD*.

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

2. Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

3. Laboratory of Experimental Pathology, CAISM– Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Address for correspondence:

Maria Carolina Szymanski de Toledo

Email: carolunicamp38@yahoo.com.br

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, PO Box 6111 State University of Campinas – UNICAMP, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Phone 0 55 19 35219305/ Fax 0 55 35219516

Luis Otávio Sarian

Email: sarian@unicamp.br

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, PO Box 6111 State University of Campinas – UNICAMP, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Phone 0 55 19 35219305/ Fax 0 55 35219516

Acknowledgements

This study was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (nº 0782-4/2016)

Abstract

Objective: to evaluate the expression patterns of HER2, steroid receptors (estrogen and progesterone) and VEGF within the adenoma-borderline-carcinoma components of low-grade serous and mucinous ovarian carcinomas. **Methods:** 63 women with ovarian low-grade serous carcinomas (LGSC) or mucinous ovarian carcinomas (MOC), treated from 1995 to 2015, and followed up through 2017 were selected. Immunohistochemistry was performed to determine the expression of ER, PR, HER2 and VEGF in the adenoma, borderline and carcinoma regions of LGSC and MOC. Four statuses were defined: 1) Loss, when the protein status is positive for a given marker in a given step in the adenoma-borderline-carcinoma theoretical transition and negative in the subsequent step (e.g. ER positive in the adenoma component and negative in the borderline component); 2) Stable negative: when the marker is negative in the two components; 3) Stable positive: when the marker is positive in the two components, and 4) Gain, when the marker is negative in a given component and positive in the subsequent (e.g. ER negative in borderline and positive in the carcinoma component). **Results:** significant upward trends were found for PR (p for trends=0.04), HER2 (p for trends<0.01) and VEGF (p for trends <0.01) in the adenoma-borderline-carcinoma transition for LGSC and MOC. The majority of expression gains occurred during the adenoma-borderline transition. **Conclusions:** our findings suggest that the patterns of ER, PR, HER2 and VEGF expression in LGSC and MOC are defined during the adenoma-borderline transition, denoting a higher probability of borderline tumor progression to invasive carcinoma when these molecules are expressed.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Keywords: low-grade serous ovarian cancer (LGSC), mucinous ovarian carcinoma (MOC), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, VEGF.

Introduction

Ovarian cancer is the most lethal gynecological malignancy (Liang et al. 2015). Among all women diagnosed with ovarian cancer, 90% will harbor epithelial cancer and, among these, 25% will be pathologically rendered as type I carcinomas, which the most common ones are low-grade serous carcinoma (LGSC) and mucinous ovarian carcinoma (MOC) (Palmirotta et al. 2017). According to recent ovarian tumor classification, proposed by the World Health Organization (WHO), LGSC might evolve from serous borderline tumors (SBTs), in a continuum from benign to malignant transformation (Kurman et al. 2014). This is because of BRAF/KRAS mutations have been shown as the key epissomal factors for the development of SBTs as well as for LGSC (Kaldawy et al. 2016). These molecular features are not shared with high-grade serous carcinoma (HGSC) (Boyd et al. 2012). On the other hand, MOCs are well-differentiated tumors and evolve from mucinous borderline tumors (MBTs). On the molecular level, several similarities between MBTs and MOCs have been described, most notably Human Epidermal factor Receptor 2 (HER2) and KRAS expression and lack of steroid hormone receptor expression (Prat et al. 2017).

Studies conducted on small patient subsets, including a few from our own research group (de Toledo et al. 2014; Sallum et al. 2012) examined whether the steroid receptors, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), may be potential markers of individualized clinical behavior of ovarian cancer and its precursor lesions. Steroid hormones normally regulate physiological processes in the ovaries and have been implicated in the pathogenesis of breast cancer as well as gynecological cancers such as endometrial cancer and epithelial ovarian cancer (EOC) (Naik et al. 2015; Buttarelli et al. 2017). Likewise, conflicting results have been reported regarding the relationship

between EOC development and the statuses of the VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and HER2 (Mohammed et al. 2017; Loizzi et al. 2017; Tarumi et al. 2017).

Contrary to what is known for breast cancer, where ER, PR and HER2 and VEGF statuses bear clear predictive significance, implicating in therapeutical opportunities for the patients whose tumors express these molecules (Taveira et al. 2017; Secq et al. 2014), the clinical significance of these molecules in the management of ovarian tumors, either BOT or EOC, remain untapped. For instance, the behavior of these markers during the transition of serous/mucinous borderline tumors to their invasive counterparts requires further clarification (Prat et al. 2017). These knowledge gaps prompted us to design the present study, for which we selected patients with LGSC and MOC associated with, respectively, serous and mucinous borderline and adenoma components. We then evaluated how HER2, steroid receptors and VEGF behave within these tumor components, and whether we may define a marker gradient accompanying the transition of adenoma to borderline and finally to carcinoma. To our knowledge, our study is the first attempt to determine whether this gradient exists.

Subjects and methods

Patient selection

The Institutional Review Board (IRB) of the State University of Campinas (Unicamp) approved this study. A total of 63 Brazilian women with LGSC and MOC who attended our gynecologic oncology clinics between 1995 and 2015, followed up until February 2017, and had paraffin-confirmed diagnoses were included for analysis. We assessed patient medical records to collect key clinical and epidemiological data. Surgeries were performed as defined by International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging for ovarian carcinomas. For analysis purposes we considered

advanced stage if it was Stage III or higher. In addition, biopsies were examined by histopathology, and the grade and disease stage were determined according to the WHO criteria, Gynecologic Oncology Group criteria, and the FIGO systems (Zeppernick et al. 2014; Meinhold-Heerlein et al. 2016).

Specimens

Tumor samples were obtained at the laparotomy before any other treatment. Slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) were generated from the original paraffin blocks that were analyzed for the selection of LGSC and MOC. These specimens were then prepared and analyzed by two experienced pathologists (LALA and LBEC). For immunohistochemical analysis, it was selected the best area within the tumor showing adenoma/borderline/carcinoma or at least two counterparts (adenoma/carcinoma or borderline/carcinoma). Then we prepared four slides of each block to make immunohistochemical analysis (one marker per slide).

Assay methods

Immunohistochemistry (IHC):

Immunohistochemistry was performed to detect the expression of ER, PR, HER2 and VEGF in 63 LGSC (29) and MOC (34) samples. Briefly, sections were deparaffinized with xylol and dehydrated in alcohol series. Endogenous peroxidase activity was blocked by using 0.3% hydrogen peroxide, followed by washes with distilled water. For antigen retrieval, we used a commercially available pressure cooker (Pascal, supplied by Dako, Carpinteria, CA, USA), in which slides were immersed in citrate buffer pH 6 for 30 minutes. The slides were dried at room temperature and washed in distilled water. After, the sections were incubated in a moist chamber, with the specific primary antibodies at

4°C, overnight (Dako, ER alpha: clone 1D5 1:300; Dako, PR: clone PgR 636 1:300; Dako, HER-2: clone c-erbB-2 Oncoprotein 1:1000; Thermal Scientific, VEGF: clone SP28 ready-to-use). The slides were then washed in PBS, pH 7.4, then incubated in Advance™ HRP Detection System (Dako) at 37°C for 1 hour, and washed in PBS. For detection, DAB chromogenic substrate (3'-diaminobenzidine, SIGMA, St Louis, MA, USA) was applied, at the proportion 0.06g to 100ml of PBS, 500µl hydrogen 3% peroxide and 1ml dimethylsulfoxide (DMSO) at 37°C for 5 minutes. Finally, the slide was washed in tap water and counterstained with Harris' hematoxylin. After being dehydrated, slides were mounted in resin (Entellan®, Merck, Darmstadt, Germany). Internal and external, positive and negative controls were used to validate the reactions. An experienced pathologist counted stained cells in each tissue under a light microscope.

Image analysis

A single observer (LBEC), blind to the clinical and pathological features of the disease, assessed the IHC staining independently. Nuclear IHC staining was considered for ER and PR. Membranous IHC staining was considered for HER2. Cytoplasmatic IHC staining was considered for VEGF. The percentage of ER, PR, HER2 and VEGF IHC stained structures was further categorized into: (0) negative, (1): less than 1% of stained nuclei, (2): 1–10% of stained nuclei, (3): 10–35% of stained nuclei, (4): 35–70% of stained nuclei and (5) : >70% of stained nuclei. The intensity was categorized as 0: negative, 1: weak, 2: moderate and 3: strong. The final score was calculated by adding the score obtained from the staining intensity to that derived from the percentage of positive cells, thus achieving theoretical results ranging from 0 to 8. For analysis purposes it was considered positive if the score reached four (4) or more.

Definition of marker status (marker outcomes) in the transition from adenoma to borderline and borderline to carcinoma

We defined the possible outcomes for marker status (ER, PR, HER2 and VEGF) expression during the transition from adenoma to borderline to carcinoma. Four statuses were arbitrarily defined: 1) Loss, when the protein status is positive for a given marker in a given step in the adenoma-borderline-carcinoma theoretical transition and negative in the subsequent step (e.g. ER positive in the adenoma component and negative in the borderline component); 2) Stable negative: when the marker is negative in the two components; 3) Stable positive: when the marker is positive in the two components, and 4) Gain, when the marker is negative in a given component and positive in the subsequent (e.g. ER negative in borderline and positive in the carcinoma component).

Statistical analysis

All statistical calculations were performed with the R environment for statistical computing (R Core Team). Confidence levels were set to 5%. We obtained 63 patients diagnosed with low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinomas. First, we calculated the proportion of samples positive for each marker in the adenoma, borderline and carcinoma components of the ovarian lesions. We used the Chi-square for trends to evaluate whether there was a directional vector of increasing/decreasing proportion of positive samples from adenoma to borderline and to carcinoma components. Fisher's T tests were used to compare the clinical characteristics of the women in relation to the expression of the steroid hormones, to HER and to VEGF statuses. We next used the Kruskal-Wallis test where appropriate to evaluate the association between marker outcomes (gain, stable negative/positive, loss) and clinical and pathological features of the tumors and women.

Results

Figure 1 is a Boxplot representation of ER, PR, HER2 and VEGF expression in the adenoma, borderline and carcinoma components of the ovarian tumors. Of the 63 cases of carcinoma included in this analysis, the borderline component was detected in 53 cases and the adenoma component in 48 cases. Protein status was available for all markers and all samples. ER expression did not differ significantly across tumor regions. By contrast, significant upwards trends were found for PR (p for trends=0.04), HER2 (p for trends<0.01) and VEGF (p for trends <0.01) statuses.

Table 1 shows a cross-tabulation of the evolving protein statuses in the adenoma to borderline transition versus the borderline to carcinoma transition. For ER, 31 cases that were stable negative in the adenoma to borderline transition remained stable negative in the borderline to carcinoma transition, whereas 11 women whose tumors were stable positive in the adenoma to borderline transition remained stable positive in the borderline to carcinoma transition. Only 3 tumors that were stable positive in the adenoma-borderline transition became negative in the borderline to carcinoma transition; another 3 cases became positive (Gain) in the adenoma to borderline transition and remained stable positive in the borderline to carcinoma transition. A similar pattern was detected for PR, with the notable exception of 4 cases that were stable negative in the adenoma to borderline transition and became positive (Gain) in the borderline to carcinoma transition. Similarly, for HER2, most cases became positive for the marker in the adenoma to borderline transition and remained so in the borderline to carcinoma transition. As for VEGF, although the marker status was defined for most cases in the adenoma to borderline transition, 6 cases that were stable negative in the adenoma to borderline transition became positive in the borderline to carcinoma transition.

Tables 2 and 3 show the association of the evolving protein statuses for the tumor markers with the key clinical features of the women in the adenoma to borderline and borderline to carcinoma transitions, respectively. Age and BMI were not associated with the evolution of protein status in none of the analyses performed.

In the adenoma to borderline transition (tables 2a and b), ER and PR status changes were significantly associated with CA125 levels ($p=0.01$ and $p=0.03$) and advanced stage ($p<0.01$ and $p=0.01$). ER status changes was also associated with tumor histological type ($p<0.01$; 29/31 stable negative tumors were mucinous, contrasted to only 2/13 stable positive and 0/3 gain tumors), recurrence ($p<0.01$; 2/31 stable negative tumors recurred contrasted to 4/13 stable positives and 2/3 gain tumors), and death ($p=0.01$). PR change patterns were also positively associated with disease stage ($p=0.01$) and serous histological type ($p<0.01$; higher proportions of stable positive and gain tumors expressed were of serous type). HER2 change status was associated with CA125 levels ($p<0.01$) and pathological type ($p=0.04$). VEGF change status was associated with death ($p<0.01$; 5/14 women with gain status died, compared to 1/27 of those with stable negative and 0/6 of those with stable positive status).

As for the borderline to carcinoma transition (tables 3a and b), we found associations similar to those found for the adenoma to borderline transition: ER status change was positively associated with increased CA125 levels ($p<0.01$), more advanced disease stage ($p<0.01$), serous subtype ($p<0.01$) and recurrence ($p<0.01$); similarly, PR change pattern was positively associated with CA125 levels ($p<0.01$), disease stage ($p<0.01$), serous subtype ($p<0.01$) and recurrence ($p=0.04$). By their turn, HER2 and VEGF change patterns were significantly associated with CA125 levels ($p<0.01$ and $p=0.04$, respectively).

Discussion

Our study shows that the expression pattern of ER, PR, HER and VEGF in low-grade serous cancer and mucinous ovarian carcinomas is most likely established – considering the adenoma to borderline to carcinoma model of tumor development (Shih et al. 2016) – during the transition from adenoma to borderline tumors. In addition, our results suggest that the acquisition of ER, PR, HER2 and VEGF positive statuses during these transitions is associated with aggressiveness features such as increased CA125 levels and worse prognosis, denoted in higher recurrence and death rates. To our knowledge, our study is the first to perform a detailed description of the expression patterns of these proteins in the adenoma to borderline and then in the borderline to carcinoma transitions. It is worth mentioning that we examined these expression patterns in different areas of the same tumors, establishing a parallel between the pattern of expression change of these proteins and the acquisition of malignant features.

The rationale behind our study resides in the sound evidence suggesting that LGSC and MOC develop from borderline lesions (Pepa et al. 2015). It thus seemed to us that the natural design for the present study was to examine the expression pattern of molecules (proteins) related to tumor behavior and prognosis in the evolving steps of tumor carcinogenesis: the adenoma-borderline-carcinoma transition. In a previous study, we examined the associations between ER, PR, and HER status with pathological features of EOC (considering all the subtypes) as well as the clinical outcomes (disease-free and overall survival) (de Toledo et al. 2014). In that study, we found no difference in patient survival in relation to these markers. Nevertheless, as long as our study was published, the knowledge pertaining to ovarian tumor development evolved and a few key concepts changed. Malpica and cols. (2004) proposed the now widely accepted two-tier system in ovarian carcinoma type I and type II (Malpica et al. 2004). Besides, nowadays it is

currently accepted that LGSC is a disease entity that stems from serous borderline tumors, whereas MOC may have its origin linked to mucinous borderline tumors, and endometrioid or clear cell tumors emerge from displaced endometrial cells (Shih et al. 2016).

Since the addition of platin-based chemotherapy, all efforts to improve the survival of women with EOC failed (Romero et al. 2013). This is also true for LGSC since it has a poor response to chemotherapy and can be often non-resectable. The Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG) affirmed the need for developing new tailored treatment regimens for this ovarian cancer (Stuart et al. 2011). Target therapies are a logical objective for current and upcoming clinical trials, and therefore a comprehensive understanding of the molecular mechanisms involved in ovarian cancer development is urgently needed.

In the present investigation, the selection of molecules (ER, PR, HER2 and VEGF) was based on the current trends linked to potential treatment targets for ovarian cancer. We also limited our analysis to LGSC and MOC, since we felt there was a knowledge gap concerning these relatively rare tumors. Wong and cols. (2007) found that ER and PR are much more expressed in LGSC than in HGSC (58% and 43% X 27% and 17%) (Wong et al. 2007). This observation led to some studies, which evaluated the benefit of using hormonal therapy to combat LGSC. Gershenson and cols. found a trend toward better outcomes for those patients that were ER+/PR+ (Diaz-Padilla et al. 2012; Gershenson et al. 2012) and improved progression free survival (PFS) for patients who received hormonal therapy consolidation after standard treatment (Schlumbrecht et al. 2011). In 2017, Buttarelli and cols. studied the hormone expression profile in LGSC. He also established the importance of new therapeutic agents based on hormone expression since LGSC is a rare and indolent carcinoma but with chemoresistance, which affects

negatively in recurrent LGSC or irresectable LGSC (Buttarelli et al. 2017). For example, Gershenson and cols. (2016) observed that patients who received hormonal maintenance therapy following treatment had statistically significant improvement in PFS (Gershenson et al. 2016). It was also shown by Buttarelli and cols. that the use of MG132 (a proteasome inhibitor) promotes an increase of ER β 1 isoform levels resulting in reduced cellular proliferation. This may suggest a potential therapeutic implication for targeting this pathway (Picard et al. 2008; Buttarelli et al. 2017). Recently, a Chinese group evaluated the expression of hormone receptor in 577 epithelial ovarian cancers and 98 borderline ovarian tumors. These authors found a greater expression of ER/PR in serous ovarian tumors than in mucinous tumors (a trend followed by serous and mucinous borderline tumors, respectively) and a similar expression of ER in HGSC and LGSC, but a higher expression of PR in LGSC ($p=0.001$) (Shenet et al. 2017). Our findings are aligned to those from these studies.

In 2014, Kim SK and cols. performed a study to analyze the expression of ER, PR and HER in MOCs and MBTs. They found that MOCs that expressed HER2 bore a better prognosis than those that did not express HER2. In vitro experiments suggest that HER2 signaling regulated by MUC 4 (mucin 4 protein) is involved in malignant transformation and invasion; therefore, a greater expression of HER2 in malignant cells than in benign cells is theoretically expected (Rodriguez et al. 2002). Our data confirms that hypothesis, since we observed an upward trend in HER2 expression from adenoma to borderline regions of the tumors, which continued during the transition from borderline to carcinoma regions of the same tumors. More recently, Mohammed and cols. (2017) studied HER2 expression in benign, borderline and malignant ovarian serous and mucinous neoplasms. Those authors reported a greater expression of HER2 in mucinous tumors than in serous tumors (Mohammed et al. 2017), which is exactly what we found in our sample. These

results suggest that HER2 antibody (trastuzumab) may be a potential drug in the arsenal to treat patients whose tumors overexpress HER2 (Nicolleti et al. 2015).

Therapies targeting VEGF, such as bevacizumab, have been proven of clinical value in EOC patients, establishing VEGF expression as a predictive marker (Komatsu et al. 2017). It has also been shown that tumors that express VEGF bear a worse prognosis, and that women harboring such tumors may benefit from anti-angiogenesis targeted therapy (Komatsu et al. 2017; Whynott et al. 2016). Our study found a significant association between the gain of expression of VEGF and death, supporting previous findings (Kuerti et al. 2017; Premalata et al. 2016).

In conclusion, the poor response of type I ovarian carcinomas to the available treatment led researchers to look for new targeted treatments. Since these tumors probably arise from borderline lesions, which in turn most likely evolved from adenomas in a sequence of progression, it seems reasonable to evaluate the molecular changes in these lesions that may contribute to their clinical behavior and potential treatment options. Our study clearly shows that the expression of such proteins (molecules) starts at an early step in the course from adenoma to carcinoma, most likely in the borderline step of tumor development. The next obvious research effort should therefore be to investigate whether borderline regions found in tumors that already evolved to carcinomas are molecularly dissimilar from borderline ovarian tumors not associated with invasive carcinoma. We are currently processing this step.

References

1. Boyd C, McCluggage WG. Low-grade ovarian serous neoplasms (low-grade serous carcinoma and serous borderline tumor) associated with high-grade serous carcinoma or undifferentiated carcinoma: report of a series of cases of an unusual phenomenon. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36(3): 368-75.
2. Buttarelli M, Mascilini F, Zannoni GF, Ciucci A, Martinelli E, Filippetti F et al. Hormone receptor expression profile of low-grade serous ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2017; 145(2): 352-60.
3. De Oliveira Taveira M, Nabavi S, Wang Y, Tonellato P, Esteva FJ, Cantley LC et al. Genomic characteristics of trastuzumab-resistant Her2-positive metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017; 143(7): 1255-1262.
4. De Toledo MC, Sarian LO, Sallum LF, Andrade LL, Vassallo J, de Paiva Silva GR et al. Analysis of the contribution of immunologically-detectable HER2, steroid receptors and of the "triple-negative" tumor status to disease-free and overall survival of women with epithelial ovarian cancer. *Acta Histochem*. 2014; 116(3): 440-7.
5. Della Pepa C, Tonini G, Santini D, Losito S, Pisano C, Di Napoli M et al. Low Grade Serous Ovarian Carcinoma: from the molecular characterization to the best therapeutic strategy. *Cancer Treat Rev*. 2015; 41(2): 136-43.
6. Diaz-Padilla I, Malpica AL, Minig L, Chiva LM, Gershenson DM, Gonzalez-Martin A. Ovarian low-grade serous carcinoma: a comprehensive update. *Gynecol Oncol*. 2012; 126(2): 279-85.
7. Gershenson DM, Sun CC, Iyer RB, Malpica AL, Kavanagh JJ, Bodurka DC et al. Hormonal therapy for recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Gynecol Oncol*. 2012; 125(3):661-6.

8. Gershenson DM. Low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Ann Oncol.* 2016; 27 Suppl 1:i45-i49.
9. Kaldawy A, Segev Y, Lavie O, Auslender R, Sopik V, Narod SA. Low-grade serous ovarian cancer: A review. *Gynecol Oncol.* 2016; 143(2): 433-438.
10. Kim SK, Cho NH. HER2-positive mucinous adenocarcinomas of the ovary have an expansile invasive pattern associated with a favorable prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(7): 4222-30.
11. Komatsu H, Oishi T, Itamochi H, Shimada M, Sato S, Chikumi J et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-A as a Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2017; 27(7): 1325-1332.
12. Kuerti S, Oliveira-Ferrer L, Milde-Langosch K, Schmalfeldt B, Legler K, Woelber L et al. VEGF-C expression attributes the risk for lymphatic metastases to ovarian cancer patients. *Oncotarget.* 2017; 8(26): 43218-43227.
13. Kurman RJ, Shih IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol.* 2016; 186(4):733-47.
14. Kurman, RJ, Carcangiu MI, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs. No 6 in IARC WHO Classification of Tumors, fourth ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2014.
15. Liang B, He Q, Zhong L, Wang S, Pan Z, Wang T, Zhao Y. Circulating VEGF as a biomarker for diagnosis of ovarian cancer: a systematic review and a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2015; 8:1075-82.

16. Loizzi V, Del Vecchio V, Gargano G, De Liso M, Kardashi A et al. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (9).
17. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28(4): 496-504.
18. Mohammed RAA, Makboul R, Elasers DAH, Elsaba TMAM, Thalab AMAB, Shaaban OMPattern of HER-2 Gene Amplification and Protein Expression in Benign, Borderline, and Malignant Ovarian Serous and Mucinous Neoplasms. *Int J Gynecol Pathol.* 2017; 36(1): 50-57.
19. Naik PS, Deshmukh S, Khandeparkar SG, Joshi A, Babanagare S, Potdar J et al. Epithelial ovarian tumors: Clinicopathological correlation and immunohistochemical study. *J Midlife Health.* 2015; 6(4):178-83.
20. Nicoletti R, Lopez S, Bellone S, Cocco E, Schwab CL, Black JD et al. T-DM1, a novel antibody-drug conjugate, is highly effective against uterine and ovarian carcinosarcomas overexpressing HER2. *Clin Exp Metastasis.* 2015; 32(1): 29-38.
21. Palmirotta R, Silvestris E, D'Oronzo S, Cardascia A, Silvestris F. Ovarian cancer: Novel molecular aspects for clinical assessment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 117:12-29.
22. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazenec G, Tremblay A. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(2): 317-30.

23. Prat J. Pathology of borderline and invasive cancers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017; 41:15-30.
24. Premalata CS, Umadevi K, Shobha K, Anurekha M, Krishnamoorthy L. Expression of VEGF-A in Epithelial Ovarian Cancer: Correlation with Morphologic Types, Grade and Clinical Stage. *Gulf J Oncolog.* 2016; 1(21): 49-54.
25. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (<http://www.R-project.org/>).
26. 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; 26:139-152.
27. Romero I, Sun CC, Wong KK, Bast RC Jr, Gershenson DM. Low-grade serous carcinoma: new concepts and emerging therapies. *Gynecol Oncol.* 2013; (3):660-6.
28. Sallum LF, Sarian LO, Lucci De Angelo Andrade L, Vassallo J, Soares FA et al. Survival of women with ovarian carcinomas and borderline tumors is not affected by estrogen and progesterone receptor status. *J Gynecol Oncol.* 2013; 24(2):167-76.
29. Schlumbrecht MP, Sun CC, Wong KN, Broaddus RR, Gershenson DM, Bodurka DC. Clinicodemographic factors influencing outcomes in patients with low-grade serous ovarian carcinoma. *Cancer.* 2011; 7(16): 3741-9.
30. Secq V, Villeret J, Fina F, Carmassi M, Carcopino X, Garcia S, et al. Triple negative breast carcinoma EGFR amplification is not associated with EGFR, Kras or ALK mutations. *Br J Cancer.* 2014; 110(4): 1045-52.

31. Shen F, Zhang X, Zhang Y, Ding J, Chen Q. Hormone receptors expression in ovarian cancer taking into account menopausal status: a retrospective study in Chinese population. *Oncotarget*. 2017; 8 (48): 84019-84027.
32. Stuart GC, Kitchener H, Bacon M, duBois A, Friedlander M, Ledermann J et al. 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference. Participants of 4th Ovarian Cancer Consensus Conference (OCCC); Gynecologic Cancer Intergroup. *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21(4): 750-5.
33. Taylor HC Jr., Malignant and semimalignant tumors of the ovary. *Surg Gynecol Obstet* 1929; 48: 204-30.
34. Tarumi Y, Mori T, Matsushima H, Kokabu T, Tsuchiya H, Kitawaki J. Long-term survival with bevacizumab in heavily pretreated and platinum-resistant mucinous ovarian cancer: A case report. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017; doi: 10.1111/jog.13496.
35. Whynott RM, Manahan P, Geisler JP. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase 2 (COX 2) immunostaining in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2016; 37(2): 164-6.
36. Wong KK, Gershenson D. The continuum of serous tumors of low malignant potential and low-grade serous carcinomas of the ovary. *Dis Markers*. 2007; 23(5-6): 377-87. Review.

**Table 1- Evolution of ER, PR, HER2 and VEGF expression in 48 cases
with adenoma-borderline-carcinoma transition**

		Transition from borderline to carcinoma			
		Loss	Stable negative	Stable Positive	Gain
Transition from adenoma to borderline	ER				
	Loss	0	0	0	0
	Stable negative	0	31	0	0
	Stable positive	3	0	11	0
	Gain	0	0	3	0
	PR				
	Loss	0	1	0	0
	Stable negative	0	31	0	4
	Stable positive	0	0	6	0
	Gain	2	0	4	0
	HER2				
	Loss	0	1	0	0
	Stable negative	0	11	0	3
	Stable positive	0	0	11	0
	Gain	2	0	20	0
	VEGF				
	Loss	0	0	0	0
	Stable negative	0	21	0	6
	Stable positive	0	0	6	0
	Gain	1	0	14	0

Note: Four statuses were arbitrarily defined: 1) Loss, when the protein status is positive for a given marker in a given step in the adenoma-borderline-carcinoma theoretical transition and negative in the subsequent step (e.g. ER positive in the adenoma component and negative in the borderline component); 2) Stable negative: when the marker is negative in the two components; 3) Stable positive: when the marker is positive in the two components, and 4) Gain, when the marker is negative in a given component and positive in the subsequent (e.g. ER negative in borderline and positive in the carcinoma component).

Table 2a. Changes in steroid receptor expression in the adenoma to borderline transition as related to key clinical features

	ER					PR				
	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p
Age (year) (mean/sd)	-	53.7 ± 17.5	48.2 ± 9.6	62.6 ± 7.2	0.21	60.4 ± NA	53.8 ± 16.5	48.1 ± 10.2	49.7 ± 15	0.67
BMI (Kg/ m ²)(mean/sd)	-	26.7 ± 5.5	27.3 ± 5.7	24.6 ± 2.5	0.64	27.2 ± NA	26.5 ± 5.2	30.9 ± 5.2	22.9 ± 4.7	0.09
CA125 (U/ml) (mean/sd)	-	119.0 ± 215.3	1608.6 ± 4516.5	623.6 ± 526.7	0.01	415.7 ± NA	155.1 ± 267.1	3070 ± 6637	449 ± 431	0.03
Menopause										
No (%)	-	12 (40%)	8 (61.5%)	0 (0%)		0 (0%)	13 (38.2%)	4 (66.7%)	3 (60%)	
Yes (%)	-	18 (60%)	5 (38.5%)	3 (100%)	0.12	1 (100%)	21 (61.8%)	2 (33.3%)	2 (40%)	0.38
Stage *										
I-II (%)	-	29 (93.5%)	5 (38.5%)	1 (33.3%)		0 (0%)	30 (85.7%)	3 (50%)	2 (40%)	
III (%)	-	2 (6.5%)	8 (61.5%)	2 (66.7%)	< 0.01	1 (100%)	5 (14.3%)	3 (50%)	3 (60%)	0.01
Histology										
Mucinous (%)	-	29 (93.5%)	2 (15.4%)	0 (0%)		0 (0%)	30 (85.7%)	1 (16.7%)	0 (0%)	
Serous (%)	-	2 (6.5%)	11 (84.6%)	3 (100%)	< 0.01	1 (100%)	5 (14.3%)	5 (83.3%)	5 (100%)	< 0.01
Recurrence										
No (%)	-	29 (93.5%)	9 (69.2%)	1 (33.3%)		1 (100%)	31 (88.6%)	4 (66.7%)	3 (60%)	
Yes (%)	-	2 (6.5%)	4 (30.8%)	2 (66.7%)	< 0.01	0 (0%)	4 (11.4%)	2 (33.3%)	2 (40%)	0.26
Death										
No (%)	-	28 (90.3%)	12 (92.3%)	1 (33.3%)		1 (100%)	31 (88.6%)	5 (83.3%)	4 (80%)	
Yes (%)	-	3 (9.7%)	1 (7.7%)	2 (66.7%)	0.01	0 (0%)	4 (11.4%)	1 (16.7%)	1 (20%)	0.91

Note: p-values calculated for using the Kruskal-Wallis test (for continuous variables) and chi-squares/Fisher test was used for categorical data comparisons, as appropriate.

***Stage definition according to FIGO (Zeppernick et al. 2014)**

Table 2b. Changes in HER2 and VEGF expression in the adenoma to borderline transition as related to key clinical features

	HER2					VEGF				
	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p
Age (year) (mean/sd)	74 ± NA	51.9 ± 15.3	48.4 ± 15.6	54.5 ± 15.5	0.44		55.8 ± 15.4	42 ± 18	51.7 ± 13.3	0.14
BMI (Kg/m ²) (mean/sd)	29.1 ± NA	25.3 ± 4.3	23.8 ± 3.8	28.8 ± 5.9	0.11		27.7 ± 5.9	25.3 ± 5.8	25.5 ± 4.1	0.28
CA125 (U/ml) (mean/sd)	6.1 ± NA	516.4 ± 493.6	153.5 ± 287.5	839.2 ± 3514.9	<0.01		187.7 ± 327.1	254.9 ± 439.9	1519.7 ± 4535.1	0.56
Menopause										
No (%)	0 (0%)	6 (50%)	4 (36.4%)	10 (45.5%)			10 (37%)	4 (80%)	6 (42.9%)	
Yes (%)	1 (100%)	6 (50%)	7 (63.6%)	12 (54.5%)	0.74		17 (63%)	1 (20%)	8 (57.1%)	0.20
Stage										
I-II (%)	1 (100%)	7 (53.8%)	10 (90.9%)	17 (77.3%)			21 (77.8%)	6 (100%)	8 (57.1%)	
III (%)	0 (0%)	6 (46.2%)	1 (9.1%)	5 (22.7%)	0.17		6 (22.2%)	0 (0%)	6 (42.9%)	0.10
Histology										
Mucinous (%)	1 (100%)	5 (38.5%)	10 (90.9%)	15 (68.2%)			20 (74.1%)	2 (33.3%)	9 (64.3%)	
Serous (%)	0 (0%)	8 (61.5%)	1 (9.1%)	7 (31.8%)	0.04		7 (25.9%)	4 (66.7%)	5 (35.7%)	0.16
Recurrence										
No (%)	1 (100%)	9 (69.2%)	10 (90.9%)	19 (86.4%)			24 (88.9%)	6 (100%)	9 (64.3%)	
Yes (%)	0 (0%)	4 (30.8%)	1 (9.1%)	3 (13.6%)	0.45		3 (11.1%)	0 (0%)	5 (35.7%)	0.06
Death										
No (%)	1 (100%)	10 (76.9%)	11 (100%)	19 (86.4%)			26 (96.3%)	6 (100%)	9 (64.3%)	
Yes (%)	0 (0%)	3 (23.1%)	0 (0%)	3 (13.6%)	0.38		1 (3.7%)	0 (0%)	5 (35.7%)	<0.01

Note: p-values calculated for using the Kruskal-Wallis test (for continuous variables) and chi-squares/Fisher test was used for categorical data comparisons, as appropriate.

NA= not available (only one women in the sample)

Table 3a – Changes in steroid receptor expression in the borderline to carcinoma transition as related to key clinical features

	RE					RP				
	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p
Age (year) (mean/sd)	46.5±4.9	53.9 ± 17.3	52.7 ± 11.1	52 ± NA	0.87	68 ± 4.2	54.3 ± 16.8	47.6 ± 10	52 ± 4.5	0.22
BMI (Kg/m ²) (mean/sd)	29.2 ± 8.5	26.9 ± 5.5	26.5 ± 5.1	19.2 ± NA	0.49	27.2 ± 7.9	26.5 ± 5.3	27.3 ± 6.3	26.8 ± 1.1	0.94
CA125 (U/ml) (mean/sd)	24.6 ± 18	139.3 ± 246.3	1525.6 ± 4037	36.4 ± NA	< 0.01	311.9 ± 350.3	133.7 ± 224.4	1974.3 ± 4867.6	516.5 ± 496.9	< 0.01
Menopause										
No (%)	1 (50%)	13 (40.6%)	7 (46.7%)	0 (0%)		0 (0%)	12 (35.3%)	7 (63.6 %)	2 (66.7%)	
Yes (%)	1 (50%)	19 (59.4%)	8 (53.3%)	0 (0%)	0.87	1 (100%)	22 (64.7%)	4 (36.4%)	1 (33.3%)	0.24
Stage										
I-II (%)	2 (100%)	30 (90.9%)	4 (25%)	1 (100%)		1 (50%)	31 (88.6%)	4 (36.4%)	1 (25%)	
III (%)	0 (%)	3 (9.1%)	12 (75%)	0 (0%)	< 0.01	1 (50%)	4 (11.4%)	7 (63.6 %)	3 (75%)	< 0.01
Histology										
Mucinous (%)	1 (50%)	31 (93.9%)	1 (6.2%)	0 (0%)		0 (0%)	32 (94.1%)	1 (9.1%)	0 (0%)	
Serous (%)	1 (50%)	2 (6.1%)	15 (93.8%)	0 (0%)	<0.01	2 (100%)	2 (5.9%)	10 (90.9%)	4 (100%)	< 0.01
Recurrence										
No (%)	2 (100%)	30 (90.9%)	9 (56.2%)	0 (0%)		1 (50%)	31 (91.2%)	7 (63.6 %)	2 (50%)	
Yes (%)	0 (%)	3 (9.1%)	7 (43.8%)	0 (0%)	<0.01	1 (50%)	3 (8.8%)	4 (36.4%)	2 (50%)	0.04
Death										
No (%)	2 (100%)	28 (89.8%)	12 (75%)	1 (100%)		1 (50%)	31 (88.6%)	9 (81.8%)	2 (50%)	
Yes (%)	0 (%)	5 (15.2%)	4 (25%)	0 (0%)	0.70	1 (50%)	4 (11.4%)	2 (18.2%)	2 (50%)	0.14

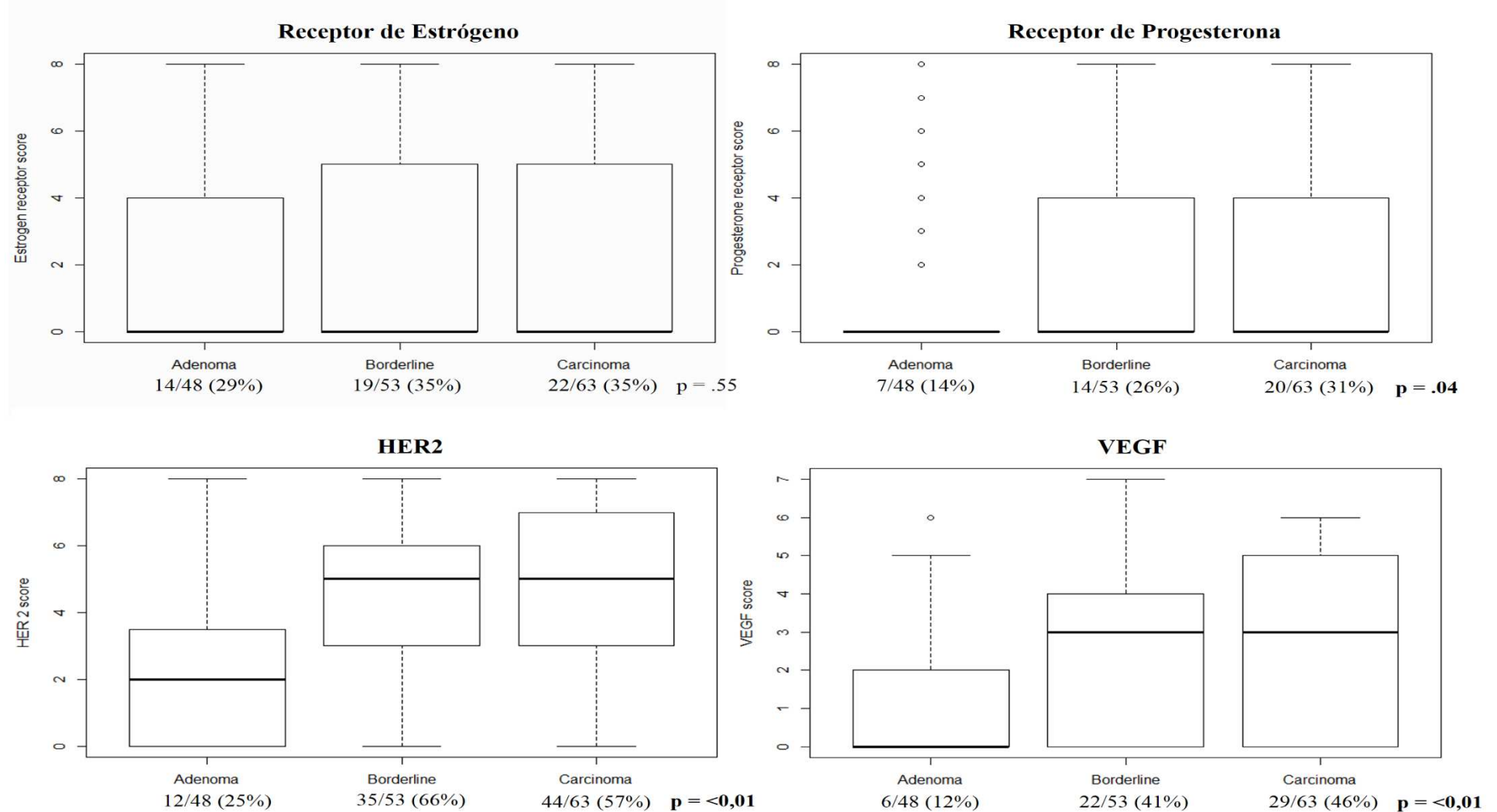
Note: p-values calculated for using the Kruskal-Wallis test (for continuous variables) and chi-squares/Fisher test was used for categorical data comparisons, as appropriate.

Table 3b – Changes in HER2 and VEGF expression in the borderline to carcinoma transition as related to key clinical features

	HER2					VEGF				
	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p	Loss	Stable(neg)	Stable(pos)	Gain	p
Age (year) (mean/sd)	68.9 ± 17	54.9 ± 16.1	51.2 ± 14.7	57.4 ± 11.2	0.38	42.9 ± NA	54.2 ± 15.2	49.2 ± 15	64.3 ± 10.3	0.11
BMI (kg/m ²) (mean/sd)	31.5 ± 6.4	25.7 ± 4.8	26.8 ± 5.8	26.3 ± 2	0.63	28.5 ± NA	27.8 ± 6.3	25 ± 4.6	27.2 ± 3.1	0.26
CA125 (U/ml) (mean/sd)	23.2 ± 7.4	570.9 ± 489.9	611.3 ± 2870.6	370.5 ± 461	<0.01	156.3 ± NA	300 ± 396.4	1114.2 ± 3760.7	22.1 ± 14.4	0.04
Menopause										
No (%)	0 (0%)	6 (50%)	15 (46.9%)	0 (0%)		1 (100%)	11 (45.8%)	9 (50%)	0 (0%)	
Yes (%)	2 (100%)	6 (50%)	17 (53.1%)	3 (100%)	0.23	0 (0%)	13 (54.2%)	9 (50%)	6 (100%)	0.09
Stage										
I-II (%)	2 (100%)	7 (50%)	26 (78.8%)	2 (66.7%)		0 (0%)	16 (64%)	15 (75%)	6 (100%)	
III (%)	0 (0%)	7 (50%)	7 (21.2 %)	1 (33.3%)	0.18	1 (100%)	9 (36%)	5 (25%)	0 (0%)	0.12
Histology										
Mucinous (%)	2 (100%)	5 (35.7%)	24 (75%)	2 (66.7%)		0 (0%)	16 (64%)	11 (57.9%)	6 (100%)	
Serous (%)	0 (0%)	9 (64.3%)	8 (25%)	1 (33.3%)	0.05	1 (100%)	9 (36%)	8 (42.1%)	0 (0%)	0.13
Recurrence										
No (%)	2 (100%)	9 (64.3%)	28 (87.5%)	2 (66.7%)		0 (0%)	20 (80%)	15 (78.9%)	6 (100%)	
Yes (%)	0 (0%)	5 (35.7%)	4 (12.5%)	1 (33.3%)	0.24	1 (100%)	5 (20%)	4 (21.1%)	0 (0%)	0.13
Death										
No (%)	2 (100%)	10 (71.4%)	29 (87.9%)	2 (66.7%)		1 (100%)	21 (84%)	15 (75%)	6 (100%)	
Yes (%)	0 (0%)	4 (28.6%)	4 (12.1 %)	1 (33.3%)	0.42	0 (0%)	4 (16%)	5 (25%)	0 (0%)	0.50

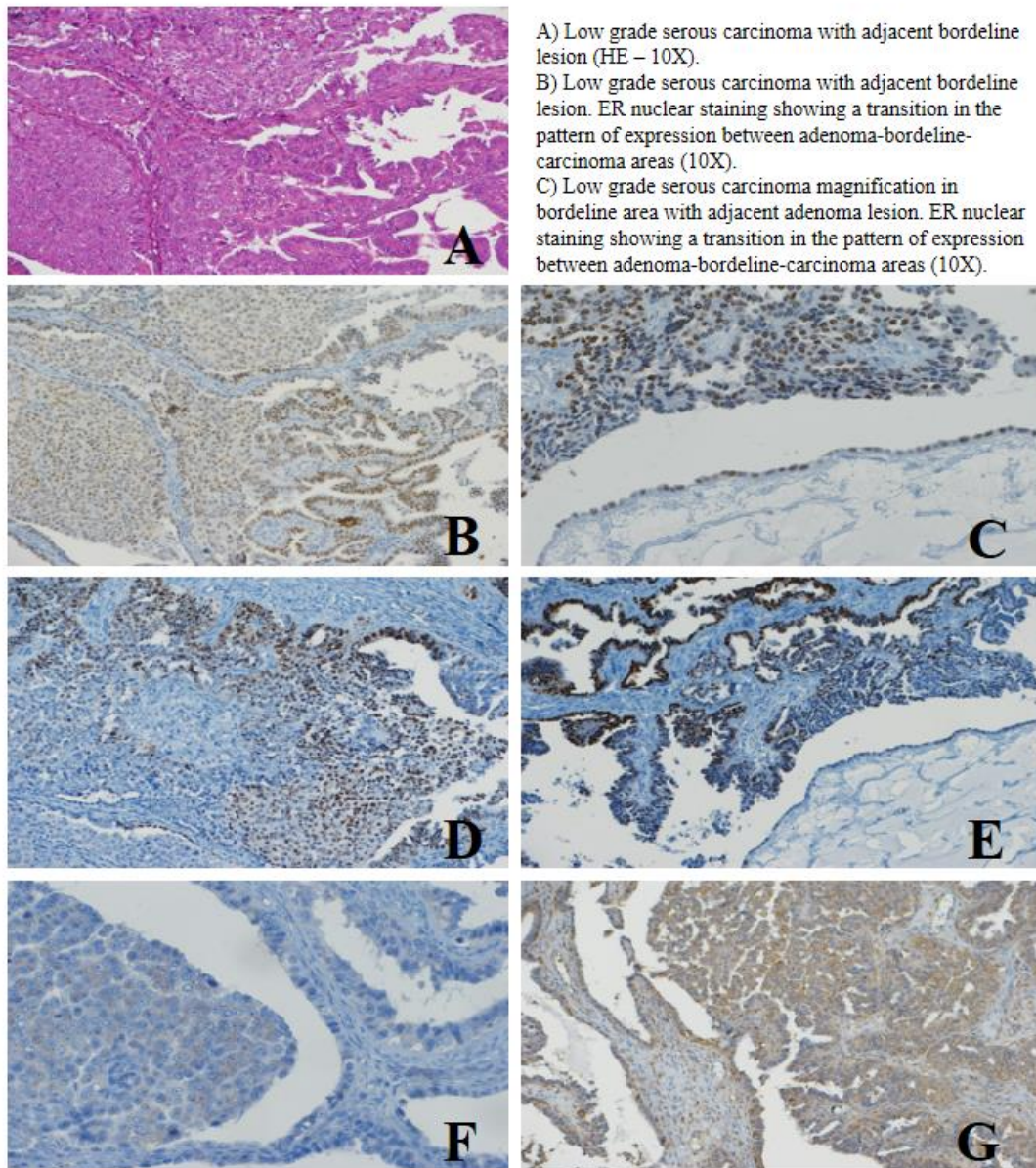
Note: p-values calculated for using the Kruskal-Wallis test (for continuous variables) and chi-squares/Fisher test was used for categorical data comparisons, as appropriate.

Figure1. Box plot representation of ER, PR, HER2 and VEGF expression in the adenoma, borderline and carcinoma components of ovarian tumors



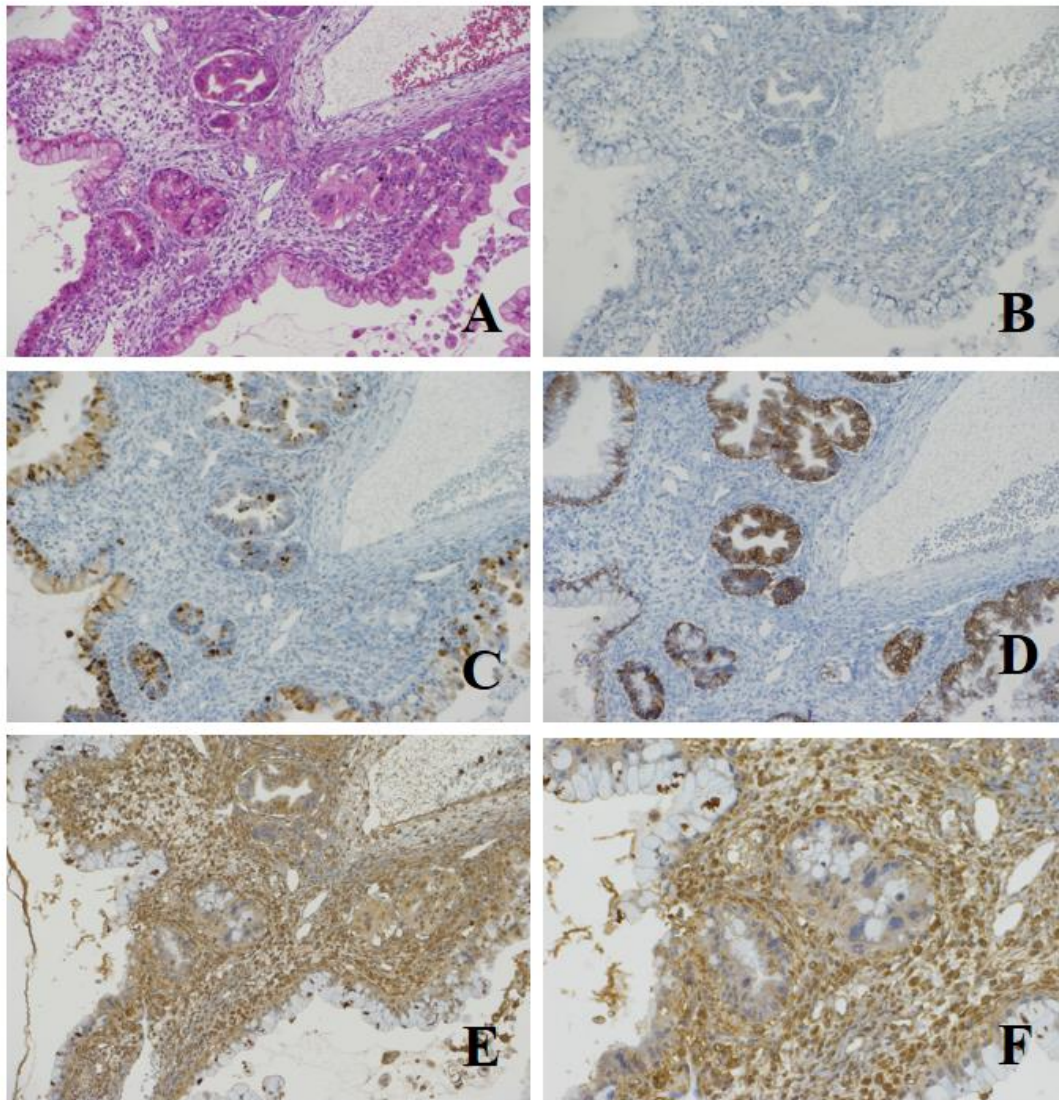
Note: ER= estrogen receptor; PR= Progesterone receptor; HER2= Human Epidermal Receptor factor 2; VEGF= Vascular Endothelial Growth Factor. Positive/Total (%) cases are presented each box. There were 63 cases with only carcinoma (without transition's components), 53 cases with borderline and carcinoma components (without adenoma component) and 48 cases with all the transitions's components (adenoma, borderline and carcinoma)

Figure 2. Expression of ER, PR, HER2 and VEGF in adjacent adenoma-borderline-carcinoma areas within the same LGSC.



- A) Low grade serous carcinoma with adjacent borderline lesion (HE – 10X).
 B) Low grade serous carcinoma with adjacent borderline lesion. ER nuclear staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 C) Low grade serous carcinoma magnification in borderline area with adjacent adenoma lesion. ER nuclear staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 D) Low grade serous carcinoma with adjacent borderline lesion. PR nuclear staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 E) Low grade serous carcinoma magnification in borderline area with adjacent adenoma lesion. PR nuclear staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 F) Low grade serous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. HER2 membranous staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 G) Low grade serous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. VEGF cytoplasmic staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).

Figure 3. Expression of ER, PR, HER2 and VEGF in adjacent adenoma-borderline-carcinoma areas within the same MOC.



- A) Mucinous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions (HE – 10X).
 B) Mucinous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. ER nuclear staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 C) Mucinous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. PR nuclear staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 D) Mucinous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. HER membranous staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 E) Mucinous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. VEGF cytoplasmatic staining showing a transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).
 F) Mucinous carcinoma with adjacent borderline and adenoma lesions. Magnification showing detailed VEGF cytoplasmatic staining and the transition in the pattern of expression between adenoma-borderline-carcinoma areas (10X).

5. Discussão geral

Dentre os principais resultados desta tese encontramos que o padrão histopatológico mais presente nos tumores *borderline* de nossa casuística foi a microinvasão. Entretanto, devido ao baixo número de recidivas (na forma *borderline* ou invasiva) não foi possível estabelecer uma relação significativa entre este dado e o comportamento clínico conforme propõem outros estudos (Silva et al. 2006; Morice et al. 2012; Chen et al. 2017; Avril et al. 2012; Boyraz et al. 2017).

Ao analisarmos o subgrupo dos carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos, observamos que 76% destes cânceres apresentam o gradiente de transição de adenoma para *borderline* para carcinoma dentro de cada tumor. Este dado corrobora a hipótese de que os carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos evoluem de lesões *borderline* e estas, de lesões benignas denominadas adenomas (Gershenson et al. 2016; Della Pepa et al. 2015). Entretanto, ainda não se sabe ao certo quais tumores *borderline* evoluirão para carcinoma, se isto está relacionado às características histopatológicas e/ou às expressões de marcadores proteicos e/ou ao tempo de evolução destes casos (Boyd et al. 2012; Seidman et al. 2000; Okoye et al. 2016).

Parte das dificuldades nessas definições reside no fato de que tanto os tumores *borderline* do ovário quanto os carcinomas serosos de baixo grau e os carcinomas mucinosos compõem uma minoria das neoplasias do ovário, limitando uma análise robusta de dados (Kaldawy et al. 2016). Além disso, até a classificação de 2014 da OMS, existia muito heterogeneidade nas nomenclaturas, impossibilitando a compilação de dados multicêntricos para aumento da casuística (Kurman et al. 2014).

As limitações terapêuticas impostas pela má resposta do carcinoma do ovário subtipo I às terapias citotóxicas padrões levaram recentemente à proposição de um modelo de estudo que avaliasse: a) novos fatores preditivos de risco para transformação de lesões *borderline* em carcinoma, para diagnóstico precoce e; b) novas vias de sinalização celular que possam ser utilizadas como terapia alvo em tumores *borderline* e carcinomas avançados e/ou recidivantes e/ou irresssecáveis (Kurman et al. 2016; Palmirotta et al. 2017). Sendo assim, optamos por elaborar um estudo que nos permitisse entender como os tumores *borderline* se apresentam histopatologicamente e como os carcinomas expressam quatro marcadores proteicos passíveis de atuação terapêutica.

Os tumores *borderline* serosos e mucinosos são tumores que se comportam de forma indolente na grande maioria dos casos e são diagnosticados em estágios iniciais. Acometem mulheres mais jovens nas

quais frequentemente são almejados tratamentos que preservem a fertilidade, os quais são realizados através de cistectomia ou salpingooforectomia unilateral sem repercussões negativas na sobrevida livre e global de doença (Chen et al. 2016). Entretanto, observa-se que algumas dessas mulheres serão diagnosticadas em estágios avançados, com doença por vezes completamente irressecável e que poderão apresentar padrão de comportamento biológico semelhante aos carcinomas de ovário com taxas de mortalidade muito parecidas. Essa dicotomia na forma de apresentação dos tumores *borderline* de ovário fez com que durante o início de seu reconhecimento pela entidade médica fosse tratado como carcinomas de ovário, incluindo cirurgias mutiladoras e quimioterapia. Esta conduta se comprovou inadequada ao longo do tempo. Então, novos estudos passaram a procurar marcadores histopatológicos e padrões de expressões de marcadores proteicos que pudessem predizer o risco de evolução para carcinoma (Chen et al. 2017).

Na classificação de 2014 da OMS estão definidos os critérios histopatológicos dos tumores *borderline* serosos e mucinosos, dentre os quais: padrão micropapilífero, microinvasão, implantes não invasivos e invasão linfonodal para os tumores serosos; e, microinvasão, carcinoma microinvasivo, carcinoma intraepitelial e nódulos murais para tumores mucinosos. Uma vez que desfechos como recidiva e óbito são eventos raros

nos tumores *borderline*, esta homogeneização nos permite realizar a comparação de trabalhos que avaliem o efeito dessas características histopatológicas no comportamento clínico destes tumores (Hauptman et al. 2017). Há atualmente vários trabalhos avaliando cada uma dessas características ou a associação entre elas e desfecho clínico. Entretanto, esses estudos têm apresentado resultados controversos.

Em 2017, uma grande casuística na Turquia demonstrou uma associação significativa entre microinvasão e recidiva nos tumores *borderline* serosos, entretanto em nossa casuística, não encontramos o mesmo comportamento biológico (Vang et al. 2017). Em contrapartida, observamos que a microinvasão está relacionada ao subtipo seroso e ao aumento nos níveis de CA125. Com isto, poderíamos inferir que em pacientes encaminhadas à cirurgia por tumores ovarianos, deveríamos atentar para a informação dos níveis de CA125 pré-operatórios. Valores elevados poderiam predizer a presença de microinvasão e, com isto, colaborar para análise mais apurada do material enviado ao patologista através de um número maior de cortes histológicos. Esta relação não foi encontrada em outros estudos da literatura de nosso conhecimento.

Um limitante de nosso estudo foi a baixa prevalência de recidivas (em lesões *borderline* ou francamente invasivas) e óbitos, o que limitou a avaliação do efeito da microinvasão no desfecho clínico dos tumores

borderline de ovário. Sendo assim, para que essas características histopatológicas sejam utilizadas como fatores preditivos de evolução para carcinoma é necessário uma análise mais robusta de dados possivelmente através de estudos multicêntricos para ampliação dos eventos de recidivas e óbitos.

Uma vez que, de acordo com a literatura atual, os carcinomas serosos de baixo grau e os carcinomas mucinosos podem se originar dos tumores *borderline* e estes são frequentemente encontrados adjacentes às áreas de carcinoma, pareceu-nos racional a análise das expressões dos marcadores proteicos dentro das áreas de transição entre adenoma, *borderline* e carcinoma do mesmo tumor (Wong et al. 2007). Nossa hipótese foi de que a detecção dos padrões de expressões dentro dessas áreas (caso sejam díspares) poderia nortear a identificação de marcadores proteicos como fatores preditivos de evolução para carcinoma, fatores prognósticos e vias de sinalização celular capazes de serem alvos em terapias sítio-específicas.

Os carcinomas serosos de baixo grau e os carcinomas mucinosos são tumores que apresentam maior estabilidade genética em comparação com os carcinomas subtipo II (carcinomas serosos de alto grau), baixa frequência de mutação no p53 e presença de mutações na via de sinalização MEK quinases com mutações frequentes nos genes BRAF e KRAS (Prat et al. 2017). A meta no tratamento cirúrgico destes tumores é a ausência de doença

residual. Quando a ressecção é incompleta, a recidiva é frequente. Por sua vez, nos casos recidivantes ou irressecáveis, a resposta aos tratamentos citotóxicos é baixa. Com base nesses dados, novas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de definir: a) marcadores preditivos de evolução para carcinoma para diagnóstico precoce; b) marcadores preditivos de resposta terapêutica a fim de definir a resposta às terapias alvo, e, c) marcadores moleculares de vias de sinalização de proliferação celular e que possam ser pontos chave no desenvolvimento de novas terapias-alvo (Premalata et al. 2016; Butarelli et al. 2017; Kim et al. 2014).

Dessa forma, selecionamos como marcadores moleculares para este estudo os receptores hormonais (estrógeno e progesterona), o *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER2) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Optamos por estas moléculas por se tratarem de alvos passíveis de terapia direcionada com padrão de expressão já bem estudados em tumores *borderline* e carcinomas de ovário isoladamente, e principalmente em outro câncer ginecológico, o mamário, o que nos permite estabelecer um paralelo como guia (De Oliveira Taveira et al. 2017; Della Pepa et al. 2015).

Os receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) são fatores envolvidos no processo de proliferação celular e apoptose, e um equilíbrio adequado na sua expressão é necessário para manutenção da

homeostase celular. Alguns trabalhos têm demonstrado alta expressão desses marcadores nos carcinomas e com isso ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados. Gersherson e cols. observaram uma melhora na sobrevida livre de doença de pacientes que fizeram terapia hormonal como manutenção após o tratamento padrão (Gersherson et al. 2012). O receptor HER2 já amplamente conhecido na patologia mamária tem sido alvo de novos estudos sobre seu papel no câncer de ovário. Tudo indica que tumores ovarianos que expressem HER2 seriam passíveis do uso de anticorpo anti HER (*Trastuzumabe*) na terapia complementar. Os trabalhos mais recentes demonstram que tumores que expressam HER2, apresentam melhor prognóstico que os demais (Kim et al. 2014). Em contrapartida, o VEGF quando expresso nos carcinomas de ovário aparenta estar relacionado à diminuição na sobrevida o que propiciaria o uso de inibidores de VEGF como o *Bevacizumabe* (Komatsu et al. 2017).

Na avaliação de nossa casuística, observamos que há uma tendência do aumento da expressão do RE, RP, HER2 e VEGF conforme há uma evolução de áreas de adenoma para *borderline* para carcinoma, sendo que essa mudança de padrão ocorre principalmente na transição de adenoma para *borderline*. Esse aumento de expressão possibilita a avaliação do uso de terapias alvo em estudos mais aprofundados. Além disso, diferentemente do que esperávamos, as áreas de lesões *bordeline* dentro destes carcinomas

apresentam as expressões dos marcadores proteicos muito mais semelhantes às áreas invasivas do que às áreas benignas. Este dado sugere que as alterações nos padrões de expressões dos marcadores proteicos envolvidos no processo de carcinogênese ocorram muito precocemente nesta transição alterando a homeostase e criando um microambiente favorável à proliferação e desenvolvimento de atipias celulares.

Observamos uma relação significativa entre níveis maiores de CA125 e aumento da expressão de RE, RP, HER2 e VEGF. Isto pode sugerir que tumores que expressem maiores níveis de CA125 tenham melhor resposta às terapias complementares. Também foi observada uma relação significativa entre as expressões dos receptores hormonais, HER2 e VEGF e o desfecho clínico (recidiva e óbito) quando essa mudança de expressão ocorreu na transição de adenoma para *borderline*. Este dado corrobora o fato de que as alterações nas expressões dos marcadores proteicos que ocorrem no início do processo de evolução para carcinoma podem estar imbricadas com o comportamento biológico do tumor. Considerando-se que mulheres diagnosticadas com tumores *borderline* de ovário que recidivam como carcinomas, tendem a apresentar uma taxa de mortalidade semelhante às mulheres diagnosticadas como carcinoma inicialmente, poderíamos supor que a expressão de VEGF nos tumores *borderline* de ovário possa funcionar como marcador para aumento no risco de recidiva como carcinoma.

Entretanto os dados dessa relação ainda são escassos para indicar determinada terapia alvo. Tal relação será mais bem averiguada em estudos em andamento por este grupo.

Concluindo, os dados obtidos indicam que os tumores *borderline* atuam como lesões precursoras dos carcinomas. Ainda são controversos quais são exatamente os marcadores histopatológicos e proteicos relacionados ao comportamento biológico e à capacidade de evolução para carcinoma. Nossa tese demonstrou que não houve relação entre características histopatológicas dos tumores *borderline* e critérios de pior prognóstico (recidiva e óbito). Entretanto, nos carcinomas, foram identificadas mudanças significativas nos padrões de expressões dos marcadores proteicos (RE, RP, HER2 e VEGF) conforme ocorre o processo de transição celular de adenoma para *borderline* dentro do tecido francamente invasor. Isto sugere que essa mudança tenha papel fundamental na criação de um microambiente que propicie à proliferação celular, ao desenvolvimento de atipias e possivelmente ao aparecimento de um maior número de alterações histopatológicas como a invasão. É de suma importância, neste momento, avaliar se os tumores *borderline* puros apresentam os padrões de expressões dos marcadores proteicos de forma diferente ou semelhante das áreas *borderline* nos carcinomas e, se há maior presença de características histopatológicas como a microinvasão em áreas *borderline* dentro dos carcinomas. A análise

detalhada destas lesões poderá encontrar marcadores preditivos de risco de evolução de *borderline* para carcinoma; assim como, vias de sinalização alvo de terapias em tumores *borderline* e carcinomas recidivantes, irressecáveis ou de maior risco de evolução para óbito.

6. Conclusão

Diante da tese apresentada, obtivemos as seguintes conclusões:

- a) Níveis elevados de CA125 e os subtipos serosos/seromucinosos estiveram significativamente associados à presença da microinvasão nos tumores *borderline*. Não foi observada a associação da presença de microinvasão com recidiva ou sobrevida global (desfecho clínico), provavelmente devido à baixa prevalência de recidivas e/ou óbitos encontrados.
- b) No estudo dessas mulheres diagnosticadas com carcinoma seroso de baixo grau e carcinoma mucinoso do ovário, as expressões dos RE, RP, HER2 e VEGF diferiram de forma significativa entre as áreas de adenoma, *borderline* e carcinoma dentro dos respectivos carcinomas. Houve aumento da expressão, principalmente no momento de transição da área de adenoma para a área de *borderline*. Este dado sugere que os padrões de expressões de ER, PR, HER e VEGF em câncer seroso de baixo grau e carcinomas mucinosos do ovário são provavelmente estabelecidos durante a transição de adenoma para *borderline*.

Por sua vez, as características clínico-patológicas associadas com as mudanças nas expressões dos marcadores foram os níveis de CA125 (RE, RP, HER2), os estádios avançados, a recorrência (RE, RP) e o óbito (VEGF). Estes resultados sugerem que as aquisições nas expressões de ER, PR, HER2 e VEGF durante os processos de transições de adenoma para *borderline* e *borderline* para carcinoma estão associadas às características de agressividade, como o aumento dos níveis de CA125 e pior prognóstico, indicado pelas recidivas e pelos óbitos.

7.Referências

1. Akahira J, Suzuki T, Ito K, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T et al. Differential expression of progesterone receptor isoforms a and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. Jpn J Cancer Res 2002; 93:807-815.
2. Albu DF, Albu CC, Văduva CC, Niculescu M, Edu A. Diagnosis problems in a case of ovarian tumor - case presentation J Morphol Embryol. 2016; 57(4):1437-42.
3. Avril S, Hahn E, Specht K, Hauptmann S, Höss C, Kiechle M et al. Histopathologic features of ovarian *borderline* tumors are not predictive of clinical outcome. Gyn Oncol. 2012; 127(3):516-24.
4. Barnhill DR, Kurman RJ, Brady MF, Omura GA, Yordan E, Given F et al. Preliminary analysis of the behavior of stage I ovarian serous tumors of low malignant potential: a gynecologic oncology group study. J Clin Oncol. 1995; 13 (11): 2752-56.

5. Borrelli GM, de Mattos LA, Andres MP, Gonçalves MO, Kho RM, Abrão MS. Role of Imaging Tools for the Diagnosis of BorderlineOvarian Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Minim Invasive Gynecol. 2017; 24 (3):353-63.
6. Boyd C, McCluggage WG. Low-grade ovarian serous neoplasms (low-grade serous carcinoma and serous borderline tumor) associated with high-grade serous carcinoma or undifferentiated carcinoma: report of a series of cases of an unusual phenomenon. Am J Surg Pathol. 2012; 36(3): 368-75.
7. Boyraz G, Salman MC, Gultekin M, Ozkan NT, Uckan HH, Gungorduk K et al.What is the impact of stromal microinvasion on oncologic outcomes in *borderline* ovarian tumors? A multicenter case-control study. Arch Gyn Obst. 2017; 296(5): 979-987.
8. Burger T, Schildhaus HU, Inniger R, Hansen J, Mayer P, Schweyer S et al. Ovarian-type epithelial tumors of the testis: immunohistochemical and molecular analysis of two serous borderline tumors of the testis. Diagn Pathol. 2015; 10: 118. doi:10.1186/s13000-015-0342-9.

9. Buttarelli M, Mascilini F, Zannoni GF, Ciucci A, Martinelli E, Filippetti F et al. Hormone receptor expression profile of low-grade serous ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2017; 145(2): 352-60.
10. Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:136–140.
11. Chen R, Li J, Zhu T, Yu H, Lu X. Fertility sparing surgery for young patients with *borderline* ovarian tumors (BOTs): single institution experience. *J Ovarian Res*. 2016; 9:16. doi: 10.1186/s13048-016-0226-y.
12. Chen X, Fang C, Zhu T, Zhang P, Yu A, Wang S. Identification of factors that impact recurrence in patients with borderline ovarian tumors. *J Ovarian Res*. 2017; 10 (1): 23. doi: 10.1186/s13048-017-0316-5.
13. Cieplinski K, Jozwik M, Semczuk-Sikora A, Gogacz M, Lewkowicz D, Ignatov A et al. Expression of p53 and selected proliferative markers (Ki-67, MCM3, PCNA and topoisomerase II) in borderline ovarian tumors: correlation with clinicopathological features. *Histol Histopathol*. 2017; doi: 10.14670/HH-11-902.

14. Cunat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 25-32.
15. De Oliveira Taveira M, Nabavi S, Wang Y, Tonellato P, Esteva FJ, Cantley LC, de Oliveira Taveira M, Nabavi S, Wang Y, Tonellato P, Esteva FJ, Cantley LC et al. Genomic characteristics of trastuzumab-resistant Her2-positive metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017; 143(7): 1255-62.
16. De Stefano I, Zannoni GF, Prisco MG, Fagotti A, Tortorella L, Vizzielli G et al. Cytoplasmatic expression of estrogen receptor beta (ER beta) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011; 122:573-579.
17. De Toledo MC, Sarian LO, Sallum LF, Andrade LL, Vassallo J, de Paiva Silva GR et al. Analysis of the contribution of immunologically-detectable HER2, steroid receptors and of the "triple-negative" tumor status to disease-free and overall survival of women with epithelial ovarian cancer. *Acta Histochem*. 2014; 116(3): 440-7.
18. Decker KD, Speth S, Brugge HG, Bart J, Massuger LFAG, Kleppe M et al. Staging procedures in patients with mucinous borderline tumors

of the ovary do not reveal peritoneal or omental disease. *Gynecol Oncol.* 2017; 144 (2): 285-89.

19. Della Pepa C, Tonini G, Santini D, Losito S, Pisano C, Di Napoli M et al. Low Grade Serous Ovarian Carcinoma: from the molecular characterization to the best therapeutic strategy. *Cancer Treat Rev.* 2015; 41(2): 136-43.
20. Diaz-Padilla I, Malpica AL, Minig L, Chiva LM, Gershenson DM, Gonzalez-Martin A. Ovarian low-grade serous carcinoma: a comprehensive update. *Gynecol Oncol.* 2012; 126(2): 279-85.
21. El-Bahrawy M, Wang J. Expression profile of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in ovarian mucinous tumours: changes in expression from benign to malignant tumors. *Histopathology.* 2015; 66 (4): 529-35.
22. Ferguson DC, Long DJ, Smith MC, Craig-Owens LD, Means J, Fadare O et al. Comparative analysis of Rb1, p16 and ER as diagnostic, prognostic and potential targets for therapeutic agents in ovarian epithelial tumors: an immunohistochemical study of 130 ovarian carcinomas. *J Ovarian Res.* 2015; 8:34. doi: 10.1186/s13048-015-0163-1.

23. Fortner RT, Ose J, Merritt MA, Schock H, Tjonneland A, Hansen L et al. Reproductive and hormone related risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic pathways, invasiveness and histologic subtypes: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2015; 137 (5): 1196-208.
24. Gershenson DM, Sun CC, Iyer RB, Malpica AL, Kavanagh JJ, Bodurka DC et al. Hormonal therapy for recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Gynecol Oncol*. 2012; 125(3):661-6.
25. Gershenson DM. Low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Ann Oncol*. 2016; 27 Suppl 1:i45-i49.
26. Gershenson DM. Management of *borderline* ovarian tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016; 41: 49-59.
27. GLOBOCAN 2012. World Health Organization. Map production: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>).
28. Gokcu M, Gungorduk K, Asicioglu O, Cetinkaya N, Gungor T, Pakay G et al. Borderline ovarian tumors: clinical characteristics, management and outcomes – a multicenter study. *J Ovarian Res*. 2016; 9 (1): 66-74.

29. Haring J, Schuler S, Lattrich C, Ortmann O, Treeck O. Role of estrogen receptor in gynecological cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 127 (3): 673-676.
30. Hauptman S, Friedrich K, Redline R, Avril S. Ovarian *borderline* tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2017; 470 (2): 125-42.
31. Helpman L, Beiner ME, Aviel-Ronen S, Perri T, Hogen L, Jakobson-Setton A et al. Safety of ovary conservation and fertility preservation in advanced *borderline* ovarian tumors. *Fertil Steril.* 2015; 104 (1): 138-44.
32. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms tumor gene, WT1. *Hum Mol Genet.* 2006; 15 (2): r196-r201.
33. Horn LC, Angermann K, Hentschel B, Eienkel J, Hohn AK. Frequency of papillary tubal hyperplasia (PTH), salpingoliths and transition from adenoma to borderline ovarian tumors (BOT): a systematic analysis of 74 BOT with different histologic types. *Pathol Res Pract.* 2017; 213 (4): 305-9.
34. Hui G, Meng M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in women with ovarian cancer: A meta-analysis. *J BUON.* 2015; 20(3): 870-8. Review.

35. Jones MB. Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management. Clin Obstet Gynecol. 2006; 49 (3): 517-25.
36. Kaldawy A, Segev Y, Lavie O, Auslender R, Sopik V, Narod SA. Low-grade serous ovarian cancer: a review. Gynecol Oncol. 2016; 143 (2): 433-8.
37. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Siriaunkgul S. Mucinous tumor of low malignant potential (*borderline* or "atypical proliferative" tumor) of the ovary: a study of 171 cases with the assessment of intraepithelial carcinoma and microinvasion. Int J Gyn Pathol. 2011; 30(3): 218-30.
38. Kim SK, Cho NH. HER2-positive mucinous adenocarcinomas of the ovary have an expansile invasive pattern associated with a favorable prognosis. Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7(7): 4222-30.
39. Komatsu H, Oishi T, Itamochi H, Shimada M, Sato S, Chikumi J et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-A as a Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2017; 27(7):1325-32.
40. Kuerti S, Oliveira-Ferrer L, Milde-Langosch K, Schmalfeldt B, Legler K, Woelber L et al. VEGF-C expression attributes the risk for

- lymphatic metastases to ovarian cancer patients. *Oncotarget*. 2017; 8(26): 43218-43227.
41. Kurman RJ, Shih IeM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*. 2008; 27(2) :151-60.
 42. Kurman RJ, Trimble CL. The behavior of serous tumors of low malignant potential: are they ever malignant? *Int J Gynecol Pathol*. 1993; 12 (2): 120-7.
 43. Kurman RJ, Shih IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016; 186(4) :733-47.
 44. Kurman, RJ, Carcangiu MI, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumors of Female Reproductive Organs. No 6 in IARC WHO Classification of Tumors, fourth ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon; 2014.
 45. Langdon SP, Gabra H, Bartlett JMS, Rabiaz GJ, Hawkins RA, Tesdale AL et al. Functionality of the progesterone receptor in ovarian

- cancer and its regulation by estrogen. Clin Can Res 1998; 4 (9): 2245-2251.
46. Lazenec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor supressor involved in ovarian carcionogenesis. Cancer Lett 2006; 231:151-157
 47. Liang B, He Q, Zhong L, Wang S, Pan Z, Wang T, Zhao Y. Circulating VEGF as a biomarker for diagnosis of ovarian cancer: a systematic review and a meta-analysis. Onco Targets Ther. 2015; 8: 1075-82.
 48. Lin CK, Lin WL, Chen FL, Lee MY, Kuo JF, Ruan A et al. Assessing the impact of polysomy-17 on HER2 status and the correlations of HER2 status with prognostic variables (ER, PR, p53, Ki-67) in epithelial ovarian cancer: a tissue microarray study using immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. Int J Gynecol Pathol 2011; 30(4): 372-379.
 49. Loizzi V, Del Vecchio V, Gargano G, De Liso M, Kardashi A et al. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. Int J Mol Sci. 2017; 18 (9).
 50. Lowry KP, Lee SI. Imaging and Screening of Ovarian Cancer. Radiol Clin North Am. 2017; 55(6):1251-59.

51. Mackenzie R, Kommoss S, Winterhoff BJ, Kipp BR, Garcia JJ, Voss J et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. *BMC Cancer*. 2015; 15: 415-25.
52. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28(4): 496-504.
53. Maniar KP, Wang Y, Visvanathan K, Shih IM, Kurman RJ. Evaluation of microinvasion and Lymph Node Involvement in Ovarian Serous *Borderline* Atypical Proliferative Serous Tumors. A morphologic and Immunohistochemical Analysis of 37 cases. *Am J Sur Pathol*. 2014; 38 (6): 743-55.
54. Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold Joachim. KRAS and BRAF mutation in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gyn Oncol*. 2006; 103: 883-7.
55. Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI, Bozzetti MC. Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: a quantitative systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 142(2): 99-105.

56. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gyn Obst.* 2016; 293(4):695-700.
57. Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2004; 159: 319- 335.
58. Mohammed RAA, Makboul R, Elasers DAH, Elsaba TMAM, Thalab AMAB, Shaaban OM Pattern of HER-2 Gene Amplification and Protein Expression in Benign, Borderline, and Malignant Ovarian Serous and Mucinous Neoplasms. *Int J Gynecol Pathol.* 2017; 36(1): 50-57.
59. Morice P, Uzan C, Fauvet R, Gouy S, Duvillard P, Darai E. Borderline ovarian tumor: pathological diagnostic dilemma and risk factors for invasive or lethal recurrence. *Lancet Oncol.* 2012; 13 (3): e103-15.
60. Naik PS, Deshmukh S, Khandeparkar SG, Joshi A, Babanagare S, Potdar J et al. Epithelial ovarian tumors: Clinicopathological correlation and immunohistochemical study. *J Midlife Health.* 2015; 6(4):178-83.

61. Nam JH. Borderline ovarian tumors and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010; 22 (3): 227-34.
62. Nicoletti R, Lopez S, Bellone S, Cocco E, Schwab CL, Black JD et al. T-DM1, a novel antibody-drug conjugate, is highly effective against uterine and ovarian carcinosarcomas overexpressing HER2. *Clin Exp Metastasis.* 2015; 32(1): 29-38.
63. Okoye E, Euscher ED, Malpica A. Ovarian low-grade serous carcinoma. A clinicopathologic study of 33 cases with primary surgery performed at a single institution. *Am J Surg Pathol.* 2016; 40 (5): 627-35.
64. Olsen CM, Cnossen J, Green AC, Webb PM. Comparison of symptoms and presentation of women with benign, low malignant potential and invasive ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2007; 28(5): 376-80.
65. Ouldamer L, Lacoste C, Cormier B, Arbion F, Marret H, Jallais L et al. Is there justification for hysterectomy in patients with borderline ovarian tumors? *Surg Oncol.* 2016; 25 (1): 1-5.
66. Palmirotta R, Silvestris E, D'Oronzo S, Cardascia A, Silvestris F. Ovarian cancer: Novel molecular aspects for clinical assessment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 117:12-29.

67. Park JM, Kim MK. Hereditary risk evaluation for borderline ovarian tumors based on immunohistochemistry. *J Menopausal Med.* 2014; 20 (1): 14-20.
68. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, Tremblay A. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(2): 317-30.
69. Piek JM, van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis: an alternative hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 622:79-87.
70. Prat J. Pathology of borderline and invasive cancers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017; 41:15-30.
71. Premalata CS, Umadevi K, Shobha K, Anurekha M, Krishnamoorthy L. Expression of VEGF-A in Epithelial Ovarian Cancer: Correlation with Morphologic Types, Grade and Clinical Stage. *Gulf J Oncolog.* 2016; 1(21): 49-54.
72. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (<http://www.R-project.org/>).
73. Rambau PF, McIntyre JB, Taylor J, Lee S, Ogilvie T, Sienko A et al. Morphologic reproducibility, genotyping, and

- immunohistochemical profiling do not support a category of seromucinous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol*. 2017; 41: 685–695.
74. Rasmussen ELK, Hannibal CG, Dehlendorff C, Baandrup L, Junge J, Vang R et al. Parity, infertility, oral contraceptives and hormone replacement therapy and the risk of ovarian serous borderline tumors: A nationwide case-control study. *Gynecol Oncol*. 2017; 144 (3): 571-6.
 75. 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; 26:139-152.
 76. Romero I, Sun CC, Wong KK, Bast RC Jr, Gershenson DM Low-grade serous carcinoma: new concepts and emerging therapies. *Gynecol Oncol*. 2013; 130(3): 660-6.
 77. Russell SE, McCluggage WG. A multistep model for ovarian tumorigenesis: the value of mutation analysis in the KRAS and BRAF genes. *J Pathol*. 2004; 203 (2): 617-9.
 78. Sallum LF, Sarian LO, Lucci De Angelo Andrade L, Vassallo J, Soares FA et al. Survival of women with ovarian carcinomas and

- borderline tumors is not affected by estrogen and progesterone receptor status. *J Gynecol Oncol*. 2013; 24(2): 167-76.
79. Schlumbrecht MP, Sun CC, Wong KN, Broaddus RR, Gershenson DM, Bodurka DC. Clinicodemographic factors influencing outcomes in patients with low-grade serous ovarian carcinoma. *Cancer*. 2011; 7(16): 3741-9.
 80. Secq V, Villeret J, Fina F, Carmassi M, Carcopino X, Garcia S, et al. Triple negative breast carcinoma EGFR amplification is not associated with EGFR, Kras or ALK mutations. *Br J Cancer*. 2014; 110(4): 1045-52.
 81. Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Human Pathol*. 2000; 31 (5): 539-57.
 82. Seidman JD, Ronnett BM, Kurman RJ. Pathology of *borderline* (low malignant potential) ovarian tumors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002; 16 (4): 499-512.
 83. Seong SJ, Kim DH, Kim MK, Song T. Controversies in borderline ovarian tumors. *J Gynecol Oncol*. 2015; 26 (4): 343-9.
 84. Shen F, Zhang X, Zhang Y, Ding J, Chen Q. Hormone receptors expression in ovarian cancer taking into account menopausal status: a

- retrospective study in Chinese population. *Oncotarget*. 2017; 8(48): 84019-27.
85. Shen W, Li HL, Liu L, Cheng JX. Expression levels of PTEN, HIF-1 α , and VEGF as prognostic factors in ovarian cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21(11): 2596-603.
 86. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004; 164(5):1511-8.
 87. Shim SH, Kim SN, Jung PS, Dong M, Kim JE, Lee SJ. Impact of surgical staging on prognosis in patients with borderline ovarian tumors: A Meta analysis. *Eur J Cancer*. 2016; 54: 84-95.
 88. Shimizu M, Toki T, Takagi Y, Konishi I, Fujii S. Immunohistochemical detection of the Wilms' tumor gene (WT1) in epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 158-163.
 89. Showell R, Romano C, Valganzon M, Lambros M, Trivedi P, Noordenn SV et al. The status of epidermal growth factor receptor in borderline ovarian tumors. *Oncotarget*. 2016; 7 (9): 10568-77.
 90. Silva EG, Gershenson DM, Malpica A, Deavers M. The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous borderline neoplasms

- with noninvasive implants is time dependent. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30 (11): 1367-71.
91. Singh N, Gilks CB. The changing landscape of gynaecological cancer diagnosis: implications for histopathological practice in the 21st century. *Histopathology*. 2017; 70 (1): 56-69.
 92. Song T, Lee DH, Jung YW, Yun BS, Seong SJ, Choi CH et al. Elevated Preoperative CA125 or CA19-9 in *Borderline* Ovarian Tumors: Could It Be Suggestive of Advanced Stage or a Poor Prognosis? *Gyn Obst Invest*. 2017; doi: 10.1159/000475817.
 93. Srinivasamurthy BC, Kulandai Velu AR, Krishnan N, Patil AS. Ovarian serous *borderline* tumors with noninvasive and invasive peritoneal implants: A case report each. *J Cancer Res Ther*. 2015; 11(3): 646. doi: 10.4103/0973-1482.147707.
 94. Stuart GC, Kitchener H, Bacon M, duBois A, Friedlander M, Ledermann J et al. 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference. Participants of 4th Ovarian Cancer Consensus Conference (OCCC); Gynecologic Cancer Intergroup. *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21(4): 750-5.

95. Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S et al. Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 2365-2372.
96. Tarumi Y, Mori T, Matsushima H, Kokabu T, Tsuchiya H, Kitawaki J. Long-term survival with bevacizumab in heavily pretreated and platinum-resistant mucinous ovarian cancer: A case report. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017; doi: 10.1111/jog.13496.
97. Tropé CG, Kaern J, Davidson B. Borderline ovarian tumors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012; 26 (3): 325-36.
98. Vang R, Hannibal CG, Junge J, Frederiksen K, Kjaer SK, Kurman RJ. Long-term Behavior of Serous *Borderline* Tumors Subdivided into Atypical Proliferative Tumors and Noninvasive Low-grade Carcinomas: A Population-based Clinicopathologic Study of 942 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2017; 41(6): 725-37.
99. Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 2009; 16 (5): 267-82.

100. Vasconcelos I, Darb-Esfahani S, Sehouli J. Serous and mucinous borderline ovarian tumors: differences in clinical presentation, high-risk histopathological features and lethal recurrence rates. *BJOG*. 2016; 123 (4): 498-508.
101. Vasconcelos I, Mendes MS. Conservative surgery in borderline tumors: A Meta analysis with emphasis on recurrence risk. *Eur J Cancer*. 2015; 51 (5): 620-31.
102. Vasconcelos I, Olschewski J, Braicu I, Sehouli J. Limited efficacy of platinum-base adjuvant treatment on the outcome of borderline ovarian tumors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 186: 26-33.
103. Wang M, Ma H. Paired box gene 2 is associated with estrogen receptor alpha in ovarian serous tumors: potential theory basis for targeted therapy. *Mol Clin Oncol*. 2016; 5 (2): 323-6.
104. Whynott RM, Manahan P, Geisler JP. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase 2 (COX 2) immunostaining in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2016; 37(2): 164-6.
105. Wong KK, Gershenson D. The continuum of serous tumors of low malignant potential and low-grade serous carcinomas of the ovary. *Dis Markers*. 2007; 23(5-6): 377-87. Review.

106. Yasunaga M, Ohishi Y, Oda Y, Misumi M, Iwasa A, Kurihara S et al. Immunohistochemical characterization of mullerian mucinous borderline tumors: possible histogenetic link with serous borderline tumors and low-grade endometrioid tumors. *Human Pathol.* 2009; 40 (7): 965-74.
107. Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005; 23 (5): 391-409.
108. Zeppernick F, Ardighieri L, Hannibal CG, Vang R, Junge J, Kjaer SK et al. BRAF mutation is associated with a specific cell type with features suggestive of senescence in ovarian serous borderline (atypical proliferative) tumors. *Am J Surg Pathol.* 2011; 38 (12): 1603-11.
109. Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch Gyn Obst.* 2014; 290 (5): 839-42.

8. Anexos

8.1. Ficha de Coleta de Dados

Caso nº _____ Iniciais: _____ HC: _____ DN: _____ Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Menarca: _____ Menopausa () S () N Tempo: _____(anos) Uso de ACO () S () N Tempo: _____(anos) Uso de TRH () S () N Tempo: _____(anos) Data do diagnóstico: _____ Queixa: () Sem queixas () Aumento do volume abdominal () Dor abdominal ou pélvica () Alterações gastrointestinais () Achado de exame de “rotina” Marcadores: CA 125 alterado () S () N Valor: _____ CEA alterado () S () N Valor: _____ Outros: _____ Procedimento cirúrgico realizado: _____ Congelação: () S () N Resultado: _____ Diagnóstico pós operatório: _____ Roto: () S () N Tamanho do tumor: _____(cm)	Estadiamento: _____ (especificar: _____) Cirurgia Preservador de Fertilidade: () S () N Tratamento adjuvante: () S () N Tipo: () Quimioterapia () Radioterapia () Quimioterapia + Radioterapia Resposta: () completa () incompleta (especificar se incompleta: _____) Se doença resistente ao tratamento adjuvante, especificar conduta: _____ Recidiva: () S () N Tempo de recidiva: _____ (meses) Anatomo patológico e local de recidiva: _____ Sobrevida livre de doença: _____ (meses) Data do óbito ou último controle (viva): _____(meses) Óbito secundário à doença: () S () N Sobrevida global: _____(meses)
---	---

8.2. Ficha de Coleta de Dados (continuação)

PRESENÇA DE MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS			EXPRESSÃO DE MARCOPES IMUNO-HISTOQUÍMICOS		
	+	-		Intensidade (0 – 1 – 2 – 3)	% células + (0 = 0% / 1 = <1 % / 2 = até 10% / 3 = até 1/3 / 4 = até 2/3 / 5 = > 2/3)
Microinvasão Tamanho Profundidade			RE		
Variante Micropapilífera Micropapilas filiformes alongadas Glândulas cribriformes revestindo a parede cística Papilas fibrovasculares de grande calibre			PR		
Implantes Invasivos (tamanho) Não invasivos (tamanho)			HER		
Implante nodal			VEGF		
SOE (serosos)					
Microinvasão (mucinosos) Tamanho Profundidade					
Carcinoma intraepitelial					
Carcinoma microinvasivo Tamanho Profundidade					
Nódulos murais					

8.3. Carta de aprovação do Comitê de Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação dos padrões morfológicos e imunoistoquímicos entre tumores borderline serosos e mucinosos de ovário e carcinomas serosos e mucinosos de baixo grau de ovário.

Pesquisador: MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84991518.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.585.510

Apresentação do Projeto:

Introdução:

Epidemiologia: Todo ano, aproximadamente 230.000 mulheres são diagnosticadas com câncer de ovário (7 para cada 100.000 mulheres). Dessas, 152.000 mulheres evoluem para óbito (4 para cada 100.000 mulheres) (GLOBOCAN), sendo mundialmente considerada a sétima causa de óbitos por câncer entre as mulheres (Naik et al. 2015). 1.2. Classificação O carcinoma de ovário responde por 90% dos casos diagnosticados anualmente. O subtipo mais frequente é o carcinoma seroso de ovário, seguido do subtipo mucinoso primário de ovário (Piek et al. 2008). Até recentemente, o câncer de ovário era compreendido como sendo uma única entidade nosológica. Entretanto, o estudo da biologia molecular demonstrou que se trata de doenças diferentes e comportamentos biológicos distintos (Russel et al. 2004). Desde a proposição de Malpica e cols.(2004), classificam-se os carcinomas serosos em alto e baixo grau, e desde a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014, os carcinomas mucinosos se referem especificamente aos carcinomas mucinosos primários de ovário de padrão intestinal (Malpica et al. 2004; Kurman et al. 2014). 1.2.1. Carcinomas serosos de baixo grau Os avanços moleculares nos permitiram compreender que os carcinomas serosos devem ser divididos em dois grupos com comportamentos biológicos distintos: os carcinomas serosos de alto grau e os carcinomas serosos de baixo grau. Os carcinomas serosos de alto grau correspondem a 90% dos casos, são os mais frequentemente estudados e possuem comportamento clínico agressivo, embora com boa resposta à quimioterapia. Apresentam

ampla instabilidade genética e mutações de p53, sendo praticamente selvagens em relação às mutações da cadeia de sinalização MAPK quinase (BRAF/KRAS) (Vang et al. 2009). Os carcinomas serosos de baixo grau são tumores indolentes, geralmente diagnosticados em estádios avançados, apresentam baixa resposta aos tratamentos citotóxicos, apresentando mutações na cadeia BRAF/KRAS similares àquelas encontradas nos tumores borderline serosos e, por conseguinte, sugerindo que tenham como lesões precursoras estes (Shih et al. 2004; Boyd et al. 2012). Segundo os estudos mais recentes, existem três possíveis teorias para o aparecimento dos carcinomas serosos de baixo grau: 1) lesões de novo sem relação direta com fatores de risco estabelecidos; 2) lesões secundárias ao processo de tumorigênese, com transformação maligna secundária à degradação oxidativa dos cistos de inclusão epitelial do parênquima ovariano e 3) através de um continuum no processo de malignização, tendo como lesões precursoras os tumores borderline do ovário (Romero et al. 2013).

1.2.2. Carcinomas mucinosos: Os carcinomas mucinosos primários do ovário são tumores bem diferenciados, indolentes, que se apresentam usualmente como grandes massas abdominais. Histologicamente são formados por células colunares que se assemelham àquelas encontradas na mucosa intestinal (goblet cells) e, por esta razão, eram anteriormente classificados como subtipo intestinal. Não fazem mais parte deste grupo nosológico, os tumores müllerianos ou os relacionados ao pseudomixoma, por se tratarem de tumores molecularmente distintos (Kim et al. 2014). Os carcinomas mucinosos bem diferenciados também apresentam com grande frequência a presença de um gradiente de evolução tumoral de adenoma para borderline para carcinoma (Kurman et al. 2008).

1.2.3. Tumores borderline do ovário De acordo com o previamente exposto, observamos que os carcinomas serosos de baixo grau e os carcinomas mucinosos do ovário estão intimamente relacionados com os tumores borderline serosos e mucinosos, respectivamente. Os tumores borderline do ovário são neoplasias de origem epitelial, caracterizados por aumento da proliferação celular e presença de atipia nuclear leve a moderada, porém sem invasão do estroma (Seidman et al. 2002). Essa entidade foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1970 e renomeada na Classificação da OMS de 2014 como “tumor proliferativo atípico” (Hauptman et al. 2017). Embora recentemente tenha se sugerido a substituição dos termos tumores borderline serosos e mucinosos para tumores serosos proliferativos atípicos e tumores mucinosos proliferativos atípicos, a nova classificação da OMS ainda aceita o termo borderline, que será utilizado nessa tese. Atualmente estima-se que 10% a 20% das neoplasias ovarianas sejam tumores borderline de ovário, sendo 55% serosos, 35% mucinosos e 10% de subtipos mais raros – endometrióides, células claras e Brenner (Tropé et al. 2012). Essas neoplasias afetam mais frequentemente mulheres em idade reprodutiva e muitas vezes sem prole definida com desejo de manutenção da fertilidade (Helpman et al. 2015). Mulheres com tumores borderline podem se apresentar ao consultório médico com queixas diversas dentre elas aumento do volume abdominal, dor pélvica e/ou irregularidade menstrual. Entretanto também podem ser assintomáticas, tendo como achado de exame de imagem a presença de uma lesão ovariana (Albu et al. 2016; Olsen et al. 2007). Ao exame ultrassonográfico (US), estas lesões podem se apresentar como cistos complexos ou uniloculares. A ressonância nuclear magnética da pelve (RNM) pode ser solicitada para melhor caracterização das lesões (Borrelli et al. 2017; Lowry et al. 2017). Os marcadores tumorais CA125 e CEA não apresentam boa

acurácia na diferenciação para este tipo de tumor (Jones et al. 2006; Medeiros et al. 2009). O diagnóstico definitivo é feito apenas após extirpação da lesão e resultado de anatomopatológico em parafina (Gershenson et al. 2016). Uma vez feito o diagnóstico, o espectro terapêutico utilizado para as mulheres com tumores borderline do ovário é extremamente heterogêneo. As diretrizes gerais de estadiamento e tratamento do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomendam cirurgia exclusiva que inclui citologia de lavado peritoneal, ressecção completa da lesão através de cistectomia ou salpingooforectomia, com ou sem histerectomia, omentectomia, biópsias peritoneais, excisão de lesões suspeitas e apendicectomia nos tumores mucinosos (Ouldamer et al. 2016). A extensão da cirurgia se correlaciona

com as características histopatológicas do exame anatomopatológico de cada subtipo e seu risco para evolução para carcinoma podendo muitas vezes ser optado por estadiamento completo de acordo com os critérios da FIGO, conforme o realizado em carcinomas (Silva et al. 2006). Os tumores borderline serosos em estágio inicial podem ser tratados apenas com a extirpação da lesão por cistectomia ou salpingooforectomia unilateral e estadiados com omentectomia, coleta de lavado peritoneal e biópsias múltiplas de peritônio. A salpingooforectomia contralateral e histerectomia são reservadas para mulheres com prole constituída (Vasconcelos et al. 2015). A linfadenectomia somente está indicada na presença de linfonodos aumentados (Shim et al. 2016). Uma revisão, incluindo 10 centros na Turquia com mais de 700 casos concluiu que a extensão da cirurgia não se relacionou com o prognóstico. Entretanto neste estudo os autores excluíram tumores borderline serosos com implantes invasivos. Os implantes invasivos são conglomerados celulares localizados em tecidos adjacentes ao ovário, com características histológicas semelhantes ao tumor original, porém que apresentam infiltração e destruição do tecido adjacente. Os implantes invasivos reclassificam os tumores borderline como carcinomas serosos de baixo grau, consequentemente devem ser tratados como tal (Gokcu et al. 2016). A sobrevida global das mulheres com tumores borderline serosos estágio I é maior que 97%. Nos casos avançados com implantes invasivos, destruição linfonodal e recidiva, a sobrevida global se assemelha aos carcinomas serosos de baixo grau (67%) (Chen et al. 2017). O tratamento cirúrgico padrão das mulheres com tumores borderline mucinosos é o mesmo que naquelas com tumores borderline serosos, acrescentando-se a apendicectomia. Entretanto, estudos recentes demonstram que a realização de apendicectomia em apêndices macroscopicamente normais não apresentou benefício na sobrevida global e na sobrevida livre de doença (Decker et al. 2017). Os tumores borderline mucinosos do ovário apresentam excelente prognóstico, pois 90% dos casos são diagnosticados no estágio I, sendo rara a recidiva e progressão da doença, conforme também observado por Seidman e cols. (Seidman et al. 2000; Seidman et al. 2002).

1.2.3.1 Tumores borderline serosos: características histopatológicas e imuno-histoquímica

Entre os tumores borderline, 55% são serosos (tumores serosos proliferativos atípicos). Estes podem se apresentar como variante micropapilífera ou cribriforme, com microinvasão e com implantes do tipo não invasivos. Também pode ser descrito acometimento linfonodal, entretanto, sem impacto sobre o prognóstico na maioria dos casos. Segundo a nova nomenclatura da OMS, de 2014, a variante micropapilífera do tumor borderline seroso passou a ser carcinoma seroso papilífero de baixo grau não invasivo. A presença de padrão micropapilífero está

significativamente associada à presença de implantes invasivos (Seidman et al. 2000). Os casos com implantes invasivos ou com substituição total do linfonodo pela neoplasia são agora classificados como carcinomas serosos de baixo grau (Hauptman et al. 2017; Okoye et al. 2016). Na análise por imuno-histoquímica, os tumores borderline serosos são caracterizados pela expressão de WT1/ PAX8, Bcl2, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) além de mutações nos genes KRAS e BRAF estarem presentes em 30% dos casos (Buttarelli et al. 2017; Showeil et al. 2016; Wang et al. 2016; Zeppernick et al. 2014). Além disso, os estudos têm demonstrado que as assinaturas moleculares dos tumores borderline serosos e dos carcinomas serosos de baixo grau são semelhantes (Kaldawy et al. 2016; Ferguson et al. 2015). Isto sugere um padrão de progressão de lesões precursoras para carcinoma (Horn et al. 2017). Malpica e cols. (2004) demonstraram a existência de um gradiente de evolução, com áreas de adenoma, tumor borderline e carcinoma invasor de baixo grau dentro do mesmo tumor. Observa-se uma perda de controle gênico sobre os processos de proliferação celular, precedendo a evolução para carcinoma seroso de baixo grau (Malpica et al. 2004). De acordo com alguns trabalhos, essas características são semelhantes nos tumores borderline e carcinomas seromucinosos (Rambau et al. 2017); razão pela qual nesta tese agrupamos os mesmos com os tumores borderline e carcinomas serosos de baixo grau.

1.2.3.2 Tumores borderline mucinosos: características histopatológicas e imunohistoquímica

Os tumores borderline mucinosos, também chamados de tumores mucinosos proliferativos atípicos, compreendem 35% dos tumores borderline. Histopatologicamente são descritas nestes tumores variantes com microinvasão, carcinoma intraepitelial (quando a atipia celular é marcada), carcinoma microinvasivo e nódulos murais, que estão associados a maior prevalência de lesão francamente invasora (Morice et al. 2012; Vasconcelos et al. 2016). O carcinoma intraepitelial está associado à maior taxa de recidiva, porém não altera o prognóstico (Hauptman et al. 2017). Os tumores borderline mucinosos eram classificados em dois tipos celulares: a) tipo intestinal e b) tipo endocervical ou mülleriano. A grande maioria é do tipo intestinal, correspondendo a 85% dos casos, com a presença de epitélio mucinoso com células caliciformes. Atualmente, pela nova classificação da OMS de 2014, quando usamos o termo tumor mucinoso, estamos nos referindo apenas ao tumor do tipo intestinal (Kurman et al. 2014). O tumor borderline mucinoso do tipo endocervical ou mülleriano passou a constituir uma nova categoria de neoplasia, denominada de tumor seromucinoso. Já foi descrito que os tumores borderline mucinosos (tipo intestinal) podem ser lesões precursoras dos carcinomas mucinosos do ovário. Como os carcinomas mucinosos de ovário são tumores grandes, a presença do gradiente de aspectos histológicos demonstrando a evolução da lesão de adenoma para tumor borderline para carcinoma dentro do mesmo tumor é frequente, corroborando a hipótese de progressão de tumores borderline para carcinoma. (Yasunaga et al. 2009). Na análise por imuno-histoquímica, os tumores borderline mucinosos são caracterizados pela ausência da expressão de WT1, RE e RP. Estes tumores podem expressar PAX8 e HER2 assim como os carcinomas mucinosos (Yasunaga et al. 2009). Um estudo recente demonstrou mudança na expressão das mucinas (principalmente 2 e 6) conforme ocorre a progressão da lesão de adenoma para borderline para carcinoma (El-Bahrawy et al. 2015). Estudos em genômica têm demonstrado que a alteração mais frequente é aquela relacionada ao gene KRAS (Mackenzie et al. 2015). Em contrapartida, a antiga variante

borderline mucinoso mülleriano, atualmente reconhecida como tumor borderline seromucinoso expressa RE e RP. Sua patogênese está provavelmente vinculada à endometriose, assim pode atuar como lesão precursora do carcinoma endometrióide de baixo Risco de progressão de lesões precursoras (borderline) para carcinoma: o estudo da expressão de marcadores proteicos Com o intuito de definir o risco de progressão de lesões borderline para carcinoma, vários marcadores proteicos vêm sendo atualmente estudados. São eles: 1) marcadores proteicos associados à transcrição com função ora de ativação ora de repressão no processo de diferenciação epiteliomesenquimal ou mesenquimoepitelial (Shen et al. 2017). 2) marcadores proteicos relacionados à transcrição de genes (Shen et al. 2017), que atuam na divisão celular e como supressores tumorais. 3) marcadores proteicos associados à proliferação celular e apoptose (Naik et al. 2015). 4) marcadores proteicos associados aos processos de neoangiogênese (Liang et al. 2015; Premalata et al. 2016). Nesta tese, em consonância com o estudo já previamente desenvolvido pela autora com carcinomas de ovário (de Toledo et al. 2014) serão examinados por imuno-histoquímica os seguintes marcadores proteicos: RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona) e Human Epidermal Growth factor Receptor 2 (HER2). De acordo com a literatura sobre o tema, optamos por acrescentar o marcador Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), pois há recentes trabalhos sugerindo o uso de Bevacizumab para carcinoma seroso de baixo grau recorrente (Komatsu et al. 2017).

1.3.1. Receptores hormonais O ovário expressa receptores de estrógeno e progesterona, sendo que a presença destes o diferencia do mesotélio do peritônio (Chang et al. 1996; Shimizu et al. 2000). A ação do estrógeno é mediada por dois receptores de estrógeno (pertencentes à superfamília de receptores nucleares), alfa (RE) e beta (RE), que através da regulação sobre a transcrição de genes têm efeitos contrários no crescimento das células do câncer de ovário (Lazennec, 2006). Alguns trabalhos sugerem que o RE atua bloqueando o efeito de proliferação celular do RE (Haring et al. 2012; Cunat et al. 2004). Entretanto, outros trabalhos que avaliaram a expressão de RE por mRNA demonstraram que a variante Re5 é frequentemente expressa no câncer de ovário com efeito proliferativo semelhante ao RE (Suzuki et al. 2008); assim como a transição da expressão do RE do núcleo para o citoplasma acarretaria em perda de sua função antagonista ao RE e consequentemente pior evolução clínica (De Stefanno et al. 2011). Já o receptor de progesterona (RP) (membro também da superfamília de receptores nucleares) está subdividido em subtipos A e B estruturalmente semelhantes, porém com atividades complementares. O subtipo A teria efeito supressor sobre o receptor de estrógeno enquanto que o subtipo B seria um potente estimulador na expressão de genes dependentes da progesterona (Akahira et al. 2002; Modugno, 2004). Os mecanismos pelos quais estrógeno e progesterona interagem na expressão clínica do câncer de ovário ainda não são completamente compreendidos. Modelos experimentais tais como o de Langdon (Langdon et al. 1998) demonstraram um efeito regulatório do estrógeno sobre a progesterona. A hipótese mais aceita é que o estrógeno – principalmente aquele presente nos folículos ovulatórios – teria efeitos genotóxico e mitogênico nas células superficiais do ovário. Em contrapartida, dados epidemiológicos sugerem que o estado de alta concentração de progesterona teria um efeito protetor por induzir apoptose.

1.3.2. Human Epidermal Growth Factor receptor 2 (HER2) O Human Epidermal Growth Factor receptor 2 (HER2) é um receptor do fator de crescimento relacionado à atividade da

tirosina quinase codificado pelo protooncogene *erbB-2* e encontrado no cromossomo 17q11. Ele faz parte de uma família de receptores que incluem HER1 (EGFR), HER3 e HER4. O HER2, assim como os demais, é um receptor transmembrânico e sua ativação inicia uma cascata intracelular que regula o crescimento, a diferenciação, a mobilidade, a adesão e a apoptose celular (Yeon et al. 2005). Diversos estudos têm demonstrado um papel central da expressão do receptor HER2 na carcinogênese (Lin et al. 2011). Recentemente alguns estudos avançaram o entendimento no papel da cadeia de quinases RAS – RAF – MEK – ERK – MAP na carcinogênese. BRAS e KRAS são proteínas dessa cadeia cujas mutações levam à ativação de fatores de proliferação celular. Acredita-se que a maioria dos tumores borderline mucinosos apresentem KRAS mutado enquanto a mutação BRAF seja mais presente nos tumores borderline serosos (Mayr et al. 2006). Essas mutações se mantêm nos carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos e os estudos para completo entendimento dessas vias de sinalização encontram-se em curso. A compreensão adequada destes mecanismos poderá levar às novas linhas terapêuticas (Kaldawy et al. 2016). No câncer de mama é conhecido o fato de que ativação do BRAF desencadeia mecanismos de resistência ao uso de linhas terapêuticas que tenham como alvo o HER2 através da ativação da via de sinalização das MAPK/ERK quinases (Taveira et al. 2017).

1.3.3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF): fator de crescimento endotelial vascular O Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), fator de crescimento endotelial vascular, é um fator mediador da angiogênese promovendo o recrutamento e a proliferação de células endoteliais e seus precursores dentro do tumor tendo papel crucial durante seu desenvolvimento. Tanto o VEGF sérico quanto o estudo da sua expressão nas células tumorais são importantes. Liang e cols. (2015) fizeram uma revisão a respeito do papel do VEGF sérico no câncer de ovário e concluíram que o mesmo apresenta uma acurácia moderada para o diagnóstico de carcinoma de ovário, porém que mais estudos são necessários (Liang et al. 2015). Quanto ao papel da expressão do VEGF nos tecidos tumorais, há diversos estudos que demonstram que tumores que expressam VEGF apresentam pior prognóstico (Loizzi et al. 2017). Por sua vez, o uso de um inibidor desta molécula (o Bevacizumab) já foi aprovado para o uso em câncer de ovário primário ou recorrente (Hui et al. 2015). Existe uma falta de consenso relacionada à origem dos tumores borderline, o que interfere na extensão do seu tratamento. A diferenciação destas lesões e a avaliação do risco de progressão para câncer são necessárias para o estabelecimento de uma conduta adequada. Muito dessa definição de risco se baseia em características histopatológicas como a presença de implantes invasivos ou carcinoma intraepitelial que podem não estar presentes na primeira cirurgia. Não há, atualmente, marcadores de risco bem estabelecidos de evolução para carcinoma com expressão imuno-histoquímica. Com o estudo das expressões dos marcadores imunohistoquímicos pretende-se avaliar se existe um padrão de risco e de progressão de adenoma para tumor borderline para carcinoma o que é definido como gradiente de evolução. Nesta tese, considerando o expressivo número de mulheres com tumores borderline e carcinomas de ovário operadas e com seguimento no Hospital da Mulher Prof. Dr. J. A. Pinotti, CAISM/Unicamp (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher/ Universidade Estadual de Campinas), realizaremos uma análise dos potenciais padrões histopatológicos e marcadores proteicos que diferenciem mulheres com maior risco de progressão para carcinoma e avaliamos a presença de vias

de sinalização celular passíveis de abordagem terapêutica. A análise das características histopatológicas e padrões de expressões de marcadores proteicos podem contribuir para a identificação de quais grupos de lesões borderline apresentariam maior risco de evolução para carcinoma, e quais carcinomas se beneficiariam do uso de terapia alvo para os marcadores proteicos estudados. Hipótese: A presença de padrão micropapilífero será significativamente maior em mulheres com tumores serosos “borderline” com implantes invasivos sendo assim categorizados como carcinoma seroso de baixo grau. Nos tumores “borderline” mucinosos, a presença de carcinoma intraepitelial será significativamente maior na presença de carcinoma mucinoso de baixo grau. As expressões dos RE e RP serão significativamente maiores nos tumores “borderline” serosos quando comparado aos mucinosos. A preservação da fertilidade será significativamente maior em mulheres sem padrão micropapilífero nos tumores “borderline” serosos. A presença de padrão micropapilífero será significativamente menor no adenoma quando comparado com o tumor “borderline” e carcinoma de baixo grau na mesma mulher. Nas mulheres com carcinoma mucinoso de baixo grau, a presença de nódulos intramurais será significativamente maior nos componentes “borderline” e carcinoma comparado com o componente adenoma. A expressão de KRAS e BRAF será significativamente maior no componente “borderline” das mulheres com carcinomas serosos de baixo grau quando comparados com os demais componentes. A expressão de mucina 2 (MUC 2) será significativamente maior nos tumores “borderline” e carcinomas mucinosos de baixo grau, enquanto que a expressão de mucina 6 (MUC 6) será significativamente menor.

Metodologia Proposta: Serão selecionados os prontuários e os respectivos blocos de parafina dos tumores das mulheres atendidas como caso novo no serviço de Oncologia Ginecológica do CAISM/Unicamp no período entre janeiro de 1995 a julho de 2015. As lâminas e blocos serão levantados junto ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Serão incluídos todos os casos de tumores “borderline” serosos, “borderline” mucinosos, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos primários de ovário que não tenham sido submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia neoadjuvantes. Serão excluídas as mulheres em que não se tenha confirmação anatomopatológica, em que as lâminas e os blocos não forem encontrados ou adequadamente fixados e preservados para realização de estudo morfológico e/ou imunoistoquímico. Uma vez selecionados os casos, será feito um levantamento de prontuário para atualização dos dados (variáveis) e da evolução de cada paciente. Após esta seleção, os blocos e lâminas serão encaminhados para processamento e análise imunoistoquímica.

Critério de Inclusão: Todos os casos de tumores borderline serosos, borderline seromucinosos, borderline mucinosos, carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos primários do ovário que não tenham sido submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia neoadjuvantes, com material de parafina adequado para estudo histopatológico e imuno-histoquímico e prontuários para levantamento dos dados clínicos.

Critério de Exclusão: Todos os tumores borderline e carcinomas, nos quais não tenhamos confirmação anatomopatológica, ou que as lâminas e os blocos não sejam encontrados ou adequadamente fixados e preservados para realização de estudo histopatológico e/ou imuno-histoquímico, ou casos em que os prontuários não possam ser encontrados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a presença de padrões morfológicos e a expressão de marcadores imuno-histoquímicos (ER /PR /HER / MUC1,2,5,6/ KRAS/ BRAF) nos tumores “borderline” serosos, mucinosos e sero-mucinosos; comparando-os com os respectivos carcinomas: serosos de baixo grau, mucinosos e carcinomas seromucinosos com e sem gradiente de progressão para adenoma, borderline e carcinoma.

Objetivo Secundário:

Comparar as características clínicas, sociodemográficas, tratamento, tempo livre de doença e sobrevida global nas mulheres com tumores “borderline” de ovário serosos, mucinosos e sero-mucinosos e nos carcinomas serosos de baixo grau e mucinosos, de acordo com o padrão morfológico e o de marcadores imuno-histoquímicos (ER /PR /HER / MUC1,2,5,6/ KRAS/ BRAF).

Comparar o padrão morfológico e de marcadores imuno-histoquímicos (ER /PR /HER / MUC1,2,5,6/ KRAS/ BRAF) dentro dos carcinomas com áreas de adenoma, borderline e carcinoma (gradiente de evolução) em mulheres com carcinomas serosos de baixo grau e carcinomas mucinosos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações da pesquisadora, sem riscos significativos para população estudada

Benefícios: Sem benefícios presumíveis imediatos à população estudada. Entretanto casos os resultados apontem na direção de alguma melhoria clínica para as pacientes as mesmas serão contactadas e informadas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma dissertação de mestrado da médica MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO, orientada pelo Prof. Dr Luis Otávio Zanatta Sarian, do CAISM/UNICAMP. Serão selecionados os blocos de parafina e prontuários de todas as mulheres com diagnóstico de tumores de ovário dos tipos “borderline” serosos e mucinosos, carcinoma seroso de baixo grau e carcinoma mucinoso tratadas no CAISM de 1995 a 2015, seguidas até fevereiro de 2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto está datada e assinada.

Projeto de pesquisa está bem descrito.

Cronograma e Orçamento (próprio) estão de acordo. Pede dispensa do TCLE (análise de prontuários e lâminas) Comprovante de vínculo com a UNICAMP está anexado.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante 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 (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. 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 e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos 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.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.
- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 06 de Abril de 2018

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini

(Coordenador)