CRISTIANE PEREIRA GOMES

CARCINOMAS PRIMÁRIOS DO OVÁRIO

Estudo imunoistoquímico do p53, PTEN e Ki67 relacionado a dados clínicos e morfológicos. Uma discussão sobre vias de carcinogênese

CAMPINAS

2005

CRISTIANE PEREIRA GOMES

CARCINOMAS PRIMÁRIOS DO OVÁRIO

Estudo imunoistoquímico do p53, PTEN e Ki67 relacionado a dados clínicos e morfológicos. Uma discussão sobre vias de carcinogênese

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Anatomia Patológica

Orientadora: *Profª Drª Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade*

CAMPINAS

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G585c

Gomes, Cristiane Pereira
Carcinomas primários do ovário estudo imunoistoquímico do p53, PTEN e Ki67 relacionado a dados clínicos e morfológicos. Uma discussão sobre vias de carcinogênese. / Cristiane Pereira Gomes. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma. 2. Ovários - Câncer. 3. Imunohistoquimica. 4. Patogenesia. I. Andrade, Liliana Aparecida Lucci De Angelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(Slp/fcm)

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a) : Prof.(a) Dr.(a) Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade

Membros:

1. **Prof. Dr. João Norberto Stávale**
2. **Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva**
3. **Prof. Dr. José Vassallo**
4. **Prof. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani**
5. **Profa. Dra. Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/10/05

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, marido e filho.

À Dra. Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade, minha professora de graduação, residência, minha orientadora por sua competência e afeto que viabilizaram o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Konradin Metze, por sua generosidade e paixão profissionais que muito contribuíram para o ordenamento e crítica de idéias e de informações.

Ao Dr. Luciano Queiroz, por suas inúmeras contribuições.

Ao pessoal dos laboratórios do Departamento de Anatomia Patológica (HC/Unicamp) e de Imunoistoquímica (CAISM/Unicamp) pela disponibilidade e ajuda na execução da parte experimental do trabalho.

Ao pessoal do SAME do CAISM que, sempre solícitos, viabilizaram o levantamento de dados clínicos.

À Cleide Moreira Silva, estatística da Câmara de pesquisa da FCM/Unicamp que, com paciência, me ajudou a traduzir números e mais números em resultados.

Aos patologistas MF, Renato, Rita, Hugo, Erni e Leandro pelo companheirismo.

Às secretárias, Maria do Carmo e Bete pela torcida, pelas lembranças de tantas datas, pelo empenho em me ajudarem a completar esse ciclo de vida e de estudos.

Ao "tio" Adilson que me auxiliou na programação visual desse e de tantos outros trabalhos.

Aos amigos queridos Renata, Lúcia, Valéria, Teresa, Sylas, Agnaldo e seu Chico.

Às pacientes.

Se você procurar bem, você acaba encontrando

Não a explicação (duvidosa) da vida,

Mas a poesia (inexplicável) da vida.

Carlos Drummond de Andrade

PÁG.

RESUMO..... *x*

ABSTRACT..... *xiii*

1- INTRODUÇÃO..... 15

2- OBJETIVOS..... 30

2.1- Objetivo geral..... 31

2.2- Objetivos específicos..... 31

3- MATERIAL E MÉTODOS..... 32

3.1- Amostra..... 33

3.2- Estudo morfológico..... 34

3.3- Dados clínicos..... 34

3.4- Marcadores imunoistoquímicos..... 34

3.5- Reações de imunoperoxidase..... 35

3.6- Análise das reações..... 37

3.7- Análise estatística..... 38

3.8- Aspectos éticos..... 38

4- RESULTADOS..... 40

5- DISCUSSÃO..... 53

6- CONCLUSÕES..... 64

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 66

8- ANEXOS..... 81

AKT/PKB	proteína kinase B, também chamada de AKT
ATM	*ataxia telangectasia mutated*
ATR	*ataxia telangectasia related*
BAD, BAX	Da família Bcl2, representam proteínas intracelulares que ajudam a regular ativação das pró-caspases
BRCA1/ BRCA2	*breast cancer associated gene*
Cdk	*cyclin – dependent kinase*
Ciclina E/ CDK2 e Ciclina D/CDK4	Complexo Ciclina/Ciclina dependente de kinase (CDK)
FAK	*focal adhesion kinase*
hMLH1	*mismatch repair gene*
LOH	perda de heterozigose
MAP kinase	*mitogen activated protein kinase*
Mdm2	proteína que direciona a p53 para degradação
MDR1	*Multidrug resistance 1*
P53	gene de supressão tumoral que codifica uma fosfoproteína regulatória de 53 quilodaltons.
P21/ P27	cyclin dependent kinase inhibitor activity (CKI)
PCNA	*proliferating cell nuclear antigen*
PI3K	*phosphatidylinositol 3 Kinase*

PIK3CA	*phosphatidylinositol 3 Kinase catalytic subunit α*
PIP3	*phosphatidylinositol- 3,4,5 triphosphate*
PTEN/ MMAC1/ TEP1	gene de supressão tumoral que codifica uma fosfatase homóloga a tensina e a auxilina (proteínas do citoesqueleto), também conhecido pela sigla MMAC1 – *mutated in multiple advanced cancers.*
Ki67	anticorpo cujo o antígeno é representado por uma proteína não-histônica de 345 e 395 quilodaltons que marca o ciclo celular com exceção de Go.

RESUMO

Os carcinomas representam 80 a 95 % das lesões malignas do ovário. As lesões epiteliais, com especial ênfase aos grupos dos tumores *borderline* e malignos, apresentam-se subclassificadas em entidades numerosas e de difícil reprodutibilidade com questionável relevância prognóstica e terapêutica denotadas pela persistência dos estádios avançados no momento do diagnóstico e pela falta de alteração significativa da sobrevida nas duas últimas décadas. A necessidade de marcadores que auxiliem na identificação de lesões precursoras, prevejam o comportamento biológico e de resposta ao tratamento dessas neoplasias são importantes não só para caracterização diagnóstica, como também, para a otimização da sobrevida .

O gene P53 codifica uma fosfoproteína de 53 quilodaltons que tem como funções a regulação do ciclo celular, a apoptose, o reparo de DNA e a senescência celular. A mutação do P53 é observada em mais de 50% dos carcinomas ovarianos e tem sido relacionada a um pior prognóstico e à quimiorresistência. Já o gene PTEN determina a produção de uma fosfatase que influencia os sinais de sobrevivência celular, de apoptose e das interações célula-matriz extra-celular e tem sido estudada em neoplasias epiteliais ovarianas como indicadora de possíveis vias de carcinogênese, de alvo de novas terapêuticas e como marcador diagnóstico/prognóstico.

Nosso estudo visou estudar esses marcadores (p53 e PTEN) como instrumentos auxiliares na caracterização dos carcinomas primários do ovário.

Setenta casos de carcinomas primários do ovário, subdivididos em 27 endometrióides, 26 serosos e 17 mucosos, foram avaliados através de reações imunoistoquímicas para o p53, PTEN e Ki67 (marcador de proliferação celular) e comparados com parâmetros morfológicos (tipo e grau histológicos) e clínicos (idade, estádio da doença e diâmetro tumoral).

A maior expressão do p53 foi observada em lesões menos diferenciadas (graus 2 e 3 histológicos), em particular no grupo dos carcinomas serosos. Os carcinomas serosos apresentaram um predomínio significativo de casos em estádios avançados (III e IV). A expressão citoplasmática da proteína PTEN foi significantemente menor (negativa) nos carcinomas endometrióides G1 que, em 60% dos casos, se mostraram associados a áreas de

endometriose. A positividade para o Ki67 foi maior nos carcinomas serosos e menor nas lesões de grau 1. Os maiores diâmetros tumorais foram observados no grupo dos carcinomas mucosos, todos de grau 1 histológico, associados em 77% dos casos a áreas de padrão benigno e *borderline*. Estes resultados permitem concluir que a maior freqüência de expressão da p53 está associada à perda da capacidade de diferenciação, em particular nas neoplasias de padrão morfológico seroso. A inativação do PTEN parece representar um fenômeno precoce no processo de carcinogênese no grupo dos carcinomas endometrióides bem diferenciados, como observado nos carcinomas de endométrio do tipo I, em associação com focos de endometriose. Os carcinomas mucosos apresentam um gradiente morfológico "adenoma-tumor borderline-carcinoma", falando a favor uma possível origiem a partir de lesões mucosas pré-existentes. Esses achados sugerem a possibilidade de que diferentes vias de carcinogenêse estejam envolvidas no processo de transformação maligna dos tumores epiteliais ovarianos.

ABSTRACT

Cell cycle regulators have been studied in epithelial ovarian neoplasms as possible indicators of pathogenetic pathways, and as way to study new therapeutic approaches and prognostic markers. PTEN and p53 are proteins that have many different cellular regulatory functions. We studied their immunohistochemical expression in seventy cases of primary ovarian carcinomas (26 serous, 27 endometrioid and 17 mucinous) and compared the results with morphological parameters (histological grade and type) and clinical data (age, stage, tumor size).

Statistical analyses showed a significantly higher expression of p53 in histologically high-grade tumors (grades 2 and 3), mainly of the serous subtype. The loss of expression of PTEN was significantly more frequent in grade 1 endometrioid adenocarcinomas which were associated with areas of endometriosis in 60% of cases. The mucinous tumors had significantly greater diameters and were associated with 77% of samples with areas of a histological pattern of "adenoma-borderline-carcinoma". P53, PTEN and Ki67 did not show association with each other, nor with diameter or stage of the tumor.

Conclusions: The higher expression of protein p53 is associated with differentiation capacity loss, especially in serous tumors. However, PTEN inactivation is an early event in carcinogenesis of the endometrioid subtype, as observed in type I endometrial carcinoma. Mucinous carcinoma were related to the "adenoma-borderline-carcinoma" histological spectrum, favoring the idea of pre-existent lesions. Our results are in keeping with different pathogenetic pathways in different types of ovarian carcinoma, prompting the search for new strategies of prevention and treatment.

1- INTRODUÇÃO

Os carcinomas primários do ovário representam hoje a quinta categoria de neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres e a quarta em taxa de mortalidade (CLAUS et al., 1995; ISMAIL et al., 2000; AUERSPERG et al., 2002; NNENE et al., 2004). Entretanto, apesar das altas taxas de prevalência e incidência na população mundial, a sobrevida pouco se tem alterado nas duas últimas décadas. Estudos demonstram que a sobrevida global em 5 anos é de aproximadamente 30-40% (WERNESS et al., 2001; NNENE et al., 2004). Esse prognóstico reservado se deve em grande parte ao fato de 75% dos casos se apresentarem no momento do diagnóstico já com doença extra-ovariana, refletindo a ausência de sintomas nos estádios mais precoces. Estádios avançados (estádios III e IV) apresentam sobrevida em 5 anos de 37 e 25%; em contrapartida, estádios iniciais da doença (estádios I e II) elevam esses índices para 93 e 70%, respectivamente (HOLSCHNEIDER e BEREK, 2000).

As neoplasias epiteliais malignas do ovário comprometem mulheres peri e pós-menopausadas predominantemente, com 80 a 90% dos casos ocorrendo após os 40 anos de idade, com pico de incidência aos 60 anos. Menos de 1% dos carcinomas ocorrem antes dos 20 anos de idade, sendo que dois terços das neoplasias malignas nesse grupo etário são representadas por tumores de células germinativas (HOLSCHNEIDER e BEREK, 2000).

Aproximadamente 80 a 95% de todos os tumores ovarianos malignos são epiteliais (CHUAQUI et al., 1998; HOLSCHNEIDER e BEREK, 2000; ISMAIL et al., 2000; PARROT et al., 2001; OKADA et al.,2002).

Segundo a vertente que predomina na literatura, essas neoplasias seriam derivadas do mesotélio modificado que reveste a superfície ovariana e do estroma subjacente, por isso denominadas de tumores epiteliais-estromais de superfície (CHUAQUI et al., 1998; DUBEAU, 1999; ISMAIL et al., 2000; FEELEY e WELLS, 2001; PARROT et al., 2001; RODRIGUEZ e DUBEAU, 2001; WELSH et al., 2001).

Esse mesotélio tem como origem o epitélio celômico do mesoderma primitivo, epitélio do qual também se derivam os ductos Müllerianos que dão origem às tubas uterinas, útero e parte proximal da vagina. Essa origem comum do epitélio de superfície

ovariano e dos ductos Müllerianos explicaria a similaridade morfológica dos tumores nesses diferentes sítios (CHUAQUI et al., 1998).

Morfologicamente esse mesotélio é constituído por células sem características fenotípicas marcantes, geradas a partir de células pluripotenciais (*stem cells*) que, portanto, apresentam capacidade de diferenciação através de múltiplas vias. Essas células contêm filamentos de citoqueratina e vimentina sendo que, em culturas, podem produzir tanto componentes das matrizes extra-celular epitelial (laminina e colágeno IV) como da mesenquimatosa (colágenos tipo I e III). Esse tecido produz uma variedade de enzimas que degradam a matriz extra-celular e conferem um "fenótipo invasivo" em cultura de células. Portanto, as características de invasividade e proteólise são repertórios de uma célula normal de superfície ovariana, não sendo propriamente uma função adquirida única e exclusivamente através das etapas que envolvem a progressão tumoral. Além disso, sua capacidade de secretar e remodelar a matriz extra-celular pode contribuir para a formação de estruturas papilíferas, que são características das neoplasias ovarianas (FEELEY e WELLS, 2001).

As células mesoteliais secretam uma ampla variedade de fatores de crescimento e citoquinas os quais afetam a esteroidogênese e influenciam as atividades proteolítica e sintética associadas à ovulação, atresia e luteólise (FEELEY e WELLS, 2001).

FATHALLA (1971) acreditava que durante as fases ovulatória (quando há exposição do epitélio de superfície ao fluído folicular rico em estrógenos) e de pós-ovulação (sob estímulos de reparo) ocorresse o aumento da atividade mitótica local levando a invaginações do mesotélio para dentro da cortical ovariana com a formação de criptas e cistos de inclusão (**Figura 1**).

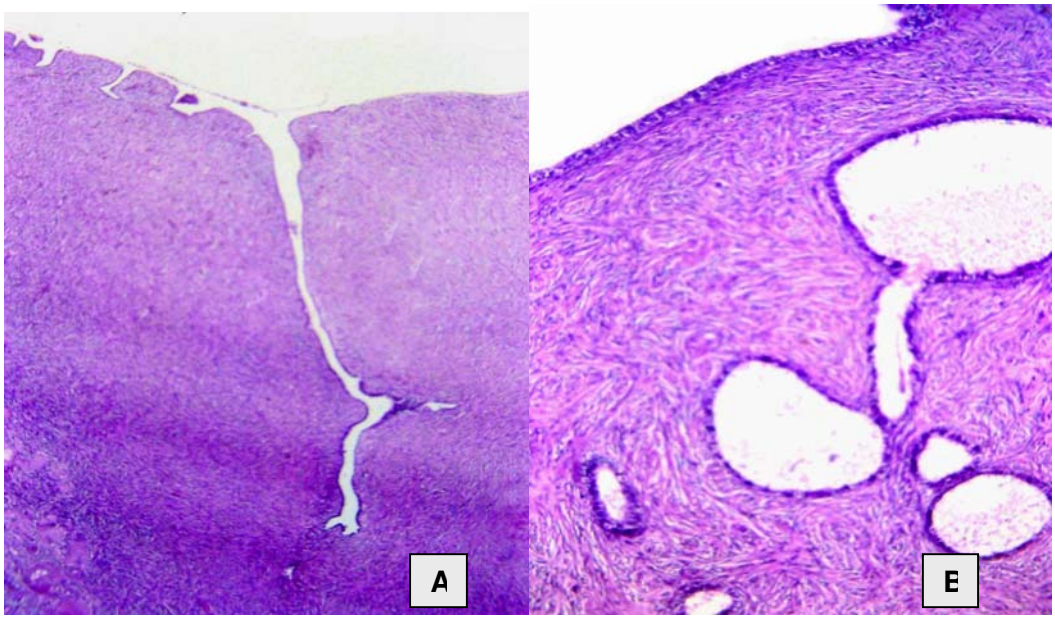


Figura 1- A - Invaginação do mesotélio de superfície para o interior da cortical ovariana (HE – 40X). **B** - Formação de cistos de inclusão epitelial (HE – 250X).

Estudos recentes observaram que as pacientes com carcinoma de ovário apresentam um número de cistos de inclusão e de invaginações corticais aumentados no ovário contralateral se comparados com grupos controles, bem como, a presença ocasional de epitélio displásico e de imunorreatividade a uma variedade de marcadores tumorais (AOKI et al.,2000).

Estudos recentes observaram que as pacientes com carcinoma de ovário apresentam um número de cistos de inclusão e de invaginações corticais aumentados no ovário contralateral se comparados com grupos controles, bem como, a presença ocasional de epitélio displásico e de imunorreatividade a uma variedade de marcadores tumorais (AOKI et al.,2000).

As células que revestem esses cistos freqüentemente passam a expressar a E-caderina, que é tanto um marcador quanto um indutor de diferenciação epitelial, reproduzindo predominantemente os padrões morfológicos tubário, endometrial e endocervical (AUERSPERG et al., 2002).

Com base no padrão histológico do epitélio de revestimento tumoral são as neoplasias classificadas como: 1) serosas (de padrão histológico tubário - que correspondem a 46% das neoplasias epiteliais ovarianas e 75 a 80% dos carcinomas); 2) mucinosas (de padrão histológico mucossecretor endocervical ou intestinal - que representam 36,5% de todos os tumores epiteliais e 10% das neoplasias malignas); 3) endometrióides (que são responsáveis por 10% dos carcinomas). Menos comuns, os tipos histológicos de células claras, de células transicionais (Brenner/Urotelial), de pequenas células, os indiferenciados e os de células escamosas contribuem conjuntamente com menos de 5% desses tumores (CHUAQUI et al.,1998).

Além do tipo celular que reveste essas lesões, outros critérios são utilizados para sua classificação histológica: a proporção dos componentes estromais e epiteliais do tumor, a localização dos elementos epiteliais – na superfície (exofítico), cístico (endofítico) e os padrões arquitetural e citológico, os quais determinam se o tumor é benigno, *borderline* (de baixo potencial de malignidade ou atipicamente proliferante) ou maligno (RUSSELL,1994).

Inúmeros são os aspectos controversos que envolvem essa classificação uma vez que não é simples a diferenciação dos tumores *borderline* com microinvasão, com carcinoma microinvasivo, com carcinoma intraepitelial ou com implantes invasivos dos carcinomas bem diferenciados, não só pela dificuldade de reprodutibilidade desses diagnósticos, mas também pela falta de critérios consensuais na literatura e de dados que prevejam efetivamente o comportamento biológico dessas variantes (SHIMIZU et al., 1998; SILVERBERG, 2000; GILKS, 2004; RONNETT et al.,2004; SEIDMAN et al., 2004; SHERMAN et al. 2004).

Portanto, além da morfologia, são necessários fatores adjuvantes que nos auxiliem a compreender as vias de oncogênese local permitindo se detectar, no curso do processo de malignização, lesões precursoras com seus respectivos marcadores tumorais. O reconhecimento de dados preditivos do comportamento biológico e do prognóstico dessas lesões forneceriam condições de individualizar efetivamente essas entidades, viabilizando estratégias terapêuticas adequadas que otimizem a sobrevida.

Nos últimos anos esforços têm sido realizados, possibilitados pelas técnicas de biologia molecular, no sentido de se mapear aspectos discriminatórios das neoplasias epiteliais ovarianas familiais das esporádicas.

A maioria dos carcinomas ovarianos é do tipo esporádico (HOLSCHNEIDER e BEREK, 2000).

Cinco a dez por cento dos carcinomas ovarianos são familiais e estão associados a mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 - *breast cancer associated gene* (CAO et al., 2003). Dois terços desses carcinomas ovarianos estão vinculados a mutações do gene BRCA1, localizado no cromossomo 17q e um terço relacionado a mutações do BRCA2, identificado no cromossomo 13q (HOLSCHNEIDER e BEREK, 2000), morfologicamente caracterizados por serem predominantemente de padrão histológico seroso de alto grau (SHAW et al., 2002).

Estudos sobre a manutenção da estabilidade genômica, vital nos processos de prevenção do câncer, dependentes da capacidade da célula de reconhecer um DNA danificado, viabilizando o seu reparo ou induzindo sua saída do ciclo celular através da apoptose, da diferenciação ou da senescência celular também representam linhas de pesquisa em desenvolvimento (OFFER et al., 2002).

O gene P53, assim denominado devido à massa molecular de seu produto protéico - uma fosfoproteína nuclear com 393 aminoácidos de 53 quilodaltons, foi o primeiro gene de supressão tumoral identificado e originalmente descrito em 1979. Durante quase uma década o P53 foi tratado como um oncogene, um promotor do ciclo celular (VOGELSTEIN et al.,2000; OFFER et al., 2002; HOFSETH et al., 2004).

Localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), representa um dos mais importantes genes em oncologia humana devendo-se sua importância ao seu envolvimento nas funções como as de controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, senescência celular e de manutenção da estabilidade genômica, atuando como fator promotor de transcrição de numerosos genes (HUTSON et al., 1995; HOFSETH et al., 2004).

O P53 não é necessário para o desenvolvimento normal de um organismo. Camundongos transgênicos nos quais as duas cópias do gene foram eliminadas parecem normais em todos os aspectos exceto em um: eles geralmente desenvolvem câncer aos três meses de idade (HOPKIN, 2002).

Numerosas são as redes através das quais o P53 é ativado, entretanto, pelo menos 3 vias independentes foram descritas: 1) acionada mediante danos no DNA como aqueles causados por radiação ionizante, sendo essa via dependente de 2 proteínas quinases (a ATM - *ataxia telangectasia mutated* e a Chk2); 2) acionada por sinais de crescimento aberrantes como a expressão dos oncogenes *Ras* e *Myc*. Nesses casos sendo a ativação dependente da proteína p14ARF; 3) induzida por uma ampla variedade de quimioterápicos, luz ultravioleta e inibidores de proteínas-quinases e podem envolver proteínas como a ATR (*ataxia telangectasia related*) e a caseína-quinase II (VOGELSTEIN et al., 2000).

Pequenas quantidades da proteína p53 selvagem são observadas na maioria das células do corpo humano sob condições fisiológicas (KUPRYJANCZYK et al.,1993; HOPKIN, 2002; LANE , 2004).

A quantidade de proteína p53 nas células é determinada em maior razão por sua taxa de degradação do que em virtude de sua produção. Todas as três vias acima descritas inibem a degradação da p53 (VOGELSTEIN et al., 2000).

A degradação se processa através de um processo chamado proteólise mediada por ubiquitina. Através de várias etapas, várias cópias de um pequeno peptídeo (ubiquitina) são ligadas à proteína p53 a ser degradada. Essa corrente de ubiquitinas atua como um "identificador" permitindo que a p53 seja detectada e degradada por proteossomas (abundante protease ATP -dependente que constitui aproximadamente 1% de toda a proteína celular). A proteína Mdm2 é uma das enzimas envolvidas na marcação da p53 com ubiquitinas (VOGELSTEIN et al.,2000; MORGAN, 2002).

Uma vez inibida sua degradação, o aumento da concentração da p53 covalentemente modificada permite que seja exercida sua maior função: se ligar a seqüências particulares de DNA e ativar o processo de transcrição (VOGELSTEIN et al.,2000).

A indução pela p53 do processo de transcrição do gene P21 gera a CKI ou p21, que tem a capacidade de ligar-se ao complexo ciclina-ciclina dependente de quinase (Ciclina E/ CDK2 e Ciclina D/ CDK4/) interrompendo a transição de G1 para a fase S do ciclo celular, viabilizando que mecanismos de reparo do DNA entrem em ação ou que se estabeleça uma parada irreversível em G1(HUTSON et al., 1995; HOFSETH; 2004).

A p53 ativa numerosos genes capazes também de causar a apoptose, como os pró-apoptóticos BAX (membros da família Bcl-2), os membros da família de receptores "Killer/DR5", o PTEN, NOXA, entre outros (VOGELSTEIN et al.,2000; STAMBOLIC et al.,2001).

A proteína p53 selvagem é uma molécula instável, de rápida degradação. Entretanto, formas mutadas dificultam o processo de proteólise, acumulando-se nos núcleos de células em transformação ou malignas (WILLIAMS, 2000).

Essa proteína pode ser identificada através de marcação imunoistoquímica por vários tipos de anticorpos. Os anticorpos monoclonais Pab 240 e 1801 reconhecem formas estruturalmente alteradas da p53, enquanto o Pab 1620 interage com a proteína em sua forma nativa ou mutante com sítio-ativo (KUPRYJANCZYK et al., 1995; CHÈNE, 1998). Já o clone DO-7 reage tanto com as formas mutadas quanto com a selvagem .

As mutações que ocorrem com o P53 são predominantemente do tipo *missense* e localizam-se preferencialmente em áreas que codificam o sítio de ligação da proteína ao DNA. Outros fenômenos como: perda de alelos, formações de complexos da proteína p53 com outras proteínas celulares ou virais, ou outros mecanismos pós-translacionais são descritos em mais de 50% das neoplasias ovarianas malignas, com enfâse no grupo dos tumores serosos (HUTSON et al., 1995).

Dados de literatura indicam que 15% dos carcinomas em estádios iniciais e 50% dos carcinomas avançados do ovário apresentam o acúmulo da proteína p53, sugerindo que as alterações gênicas representem um evento tardio no processo de carcinogênese (BERCCHUCK et al,1994).

Entretanto, observa-se positividade para a proteína p53 em ambos os componentes dos carcinossarcomas ovarianos sugerindo que a mutação anteceda a diferenciação dos elementos em epitelial e mesenquimatoso podendo, portanto, ocorrer em fases mais iniciais da oncogênese (KUPRYJANCZYK et al.,1995).

A positividade da p53 sugere fortemente a malignização do epitélio ovariano (KLEMI et al.,1994; HUTSON et al., 1995) e tem sido relacionada a dados morfológicos, prognósticos e de quimio-resistência (BOSARI et al., 1993; HENRIKSEN et al., 1994; KIYOKAWA,1994; BLANDINO et al., 1999; SATO et al., 2000; OTIS et al.,2000; SAGARRA et al., 2002; LASSUS et al., 2003).

A inter-relação do P53 com outro gene de supressão tumoral também estudado na oncogênese ovariana, o PTEN, é descrita (STAMBOLIC et al., 2001; MAYO e DONNER, 2002; FREEMAN et al., 2003).

Em 1997, foi pela primeira vez isolado e seqüenciado um novo candidato a gene de supressão tumoral. Denominado PTEN, MMAC1 ou TEP1, este gene é constituído por 100 quilobases no cromossomo humano 10q23 e apresenta seqüências homólogas com as das famílias das proteínas tirosina-fosfatase (PTPase), tensina e auxilina (TAMURA et al., 1998; PERREN et al., 1999; SAITO et al., 2000; STAMBOLIC et al., 2001; FERNANDEZ e ENG, 2002; WAITE e ENG, 2002; HAN et al., 2003).

Foi descoberto a partir do mapeamento genético de áreas de susceptibilidade para a Síndrome de Cowden (desordem autossômica dominante que se caracteriza por múltiplos tumores-hamartomas com predisposição para as neoplasias mamárias, tireoidianas, do endométrio e lesões hamartomatosas benignas em pele e cérebro, bem como, observadas mutações também nas síndromes de Bannayan-Ruvalcaba-Riley e da polipose juvenil (MYERS et al., 1997; MAEHAMA e DIXON, 1999; SALVESEN et al., 2001; FERNANDEZ e ENG, 2002; WAITE e ENG, 2002).

A deleção em homozigose do PTEN nos três folhetos embrionários leva a morte precoce do embrião (XU et al., 2002). Sua expressão no camundongo é disseminada antes da organogênese, sendo observada em altos níveis na pele, mama, tireóide e cérebro,

principais sítios predisponentes ao desenvolvimento de neoplasias em adultos frente a uma função defectiva do PTEN (AUERSPERG et al., 2002; SHENG et al., 2002).

O PTEN codifica uma proteína de 403 aminoácidos, uma fosfatase com dupla especificidade, capaz de modular a proliferação celular, parada do ciclo celular, apoptose, migração e adesão (GEORGESCU et al., 1999).

Um de seus substratos, de natureza protéica, é a FAK - quinase de adesão focal (TAMURA et al.,1998).

É reconhecido que quando fibroblastos e células epiteliais normais são postas em meios de cultura em suspensão, soltas, sem superfície sólida de adesão, essas células sofrem mudanças conformacionais, ficando arredondadas e quase nunca entram em divisão (**Figura 2**). Esse fenômeno é conhecido como dependência de ancoragem da divisão celular (MORGAN, 2002).

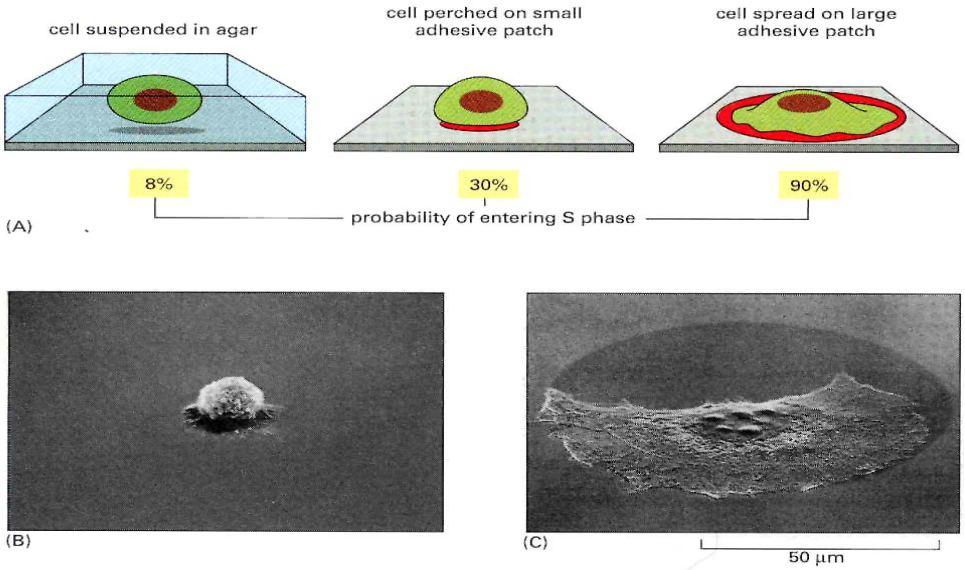


Figura 2- Fenômeno de dependência de ancoragem da divisão celular (MORGAN, D. *The cell cycle and programmed cell death. In: ALBERTS, B.* ***Molecular Biology of the Cell***, New York: Garland Science, 2002. p. 1022).

Entretanto, quando essas células podem aderir a um substrato sólido, rapidamente são formadas adesões focais com moléculas da matriz extracelular (laminina e fibronectina) que, interagindo com receptores de superfície (integrinas) ligados a actina do citoesqueleto, ativam quinases incluindo a quinase de adesão focal (FAK), a qual promove sinais intracelulares e sobrevivência, crescimento e divisão celular - **Figura 3** (MORGAN, 2002).

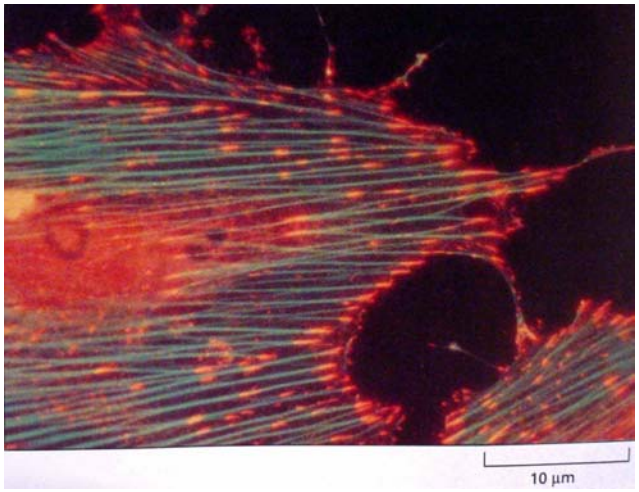


Figura 3- Micrografia fluorescente de cultura de fibroblastos. Em verde cora-se a actina e em vermelho a proteína fosfotirosina. Em áreas de sobreposição de colorações, observa-se o resultado alaranjado. Nas terminações dos filamentos de actina, onde se estabelecem contatos focais com o substrato (superfície), concentra-se também a fosfoproteína o que expressa as interações da matriz extracelular com membrana plasmática, com fatores promotores da ativação do ciclo celular e com o citoesqueleto. (MORGAN, D. *The cell cycle and programmed cell death. In: ALBERTS, B.* ***Molecular Biology of the Cell***, New York: *Garland Science*, 2002. p. 1023).

Outro aspecto funcional da FAK é sua relação com a migração celular. A migração ocorre com a célula estendendo sua porção "proximal", a qual se adere firmemente ao substrato por junções de adesão focal, e retraindo a sua porção "distal", rompendo as junções de adesão focal previamente estabelecidas (COLLARES-BUZATO, 2001). Essa relação é especialmente interessante quando se pensa em invasão e disseminação tumorais.

A ligação da proteína PTEN a FAK regula negativamente a ativação dessa quinase, inibindo a proliferação e migração celulares através da interação célula-matriz extracelular (TAMURA et al.,1998; TAMURA et al., 1999).

Além disso, sob condições de ancoragem-independente, o PTEN induz a *anoikis*, um tipo especial de apoptose (MILLS et al.,2001).

O PTEN apresenta um segundo substrato de natureza lipídica representado pelo fosfatidilinositol trifosfato ou PIP3 (LEE et al., 1999; SATO et al., 2000; XU et al., 2002; PARSONS, 2004).

Frente a fatores de crescimento, o fosfatidilinositol (PI) presente na face citosólica da membrana plasmática é fosforilada pela fosfatidilinositol 3-Kinase/AKT (PI3K-AKT), produzindo o fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato (PIP3) que atua como um segundo mensageiro intracelular que estimula o crescimento e a divisão através da ativação de uma proteína quinase tireonina/serina, a AKT/PKB (MYERS et al., 1998; MAEHAMA e DIXON, 1999; MARTINI et al., 2002; WAITE e ENG , 2002; HAN et al., 2003).

O PTEN desfosforila o PIP3, inativando-o , bloqueando a ativação da AKT (MAEHAMA e DIXON, 1999; MILLS et al., 2001, SULIS e PARSONS, 2003) . Interessante notar que a PI3K apresenta sua atividade estimulada em 40% dos carcinomas ovarianos, devido à amplificação de uma de suas subunidades, a PIK3CA (SHAYESTEH et al., 1999; ZHANG et al., 2003; CAMPBELL et al., 2004; PARSONS, 2004).

O PTEN também favorece a função do p53, uma vez que inibe a AKT, a qual fosforila a Mdm2, que degrada o p53, como demonstrado na **Figura 4**.

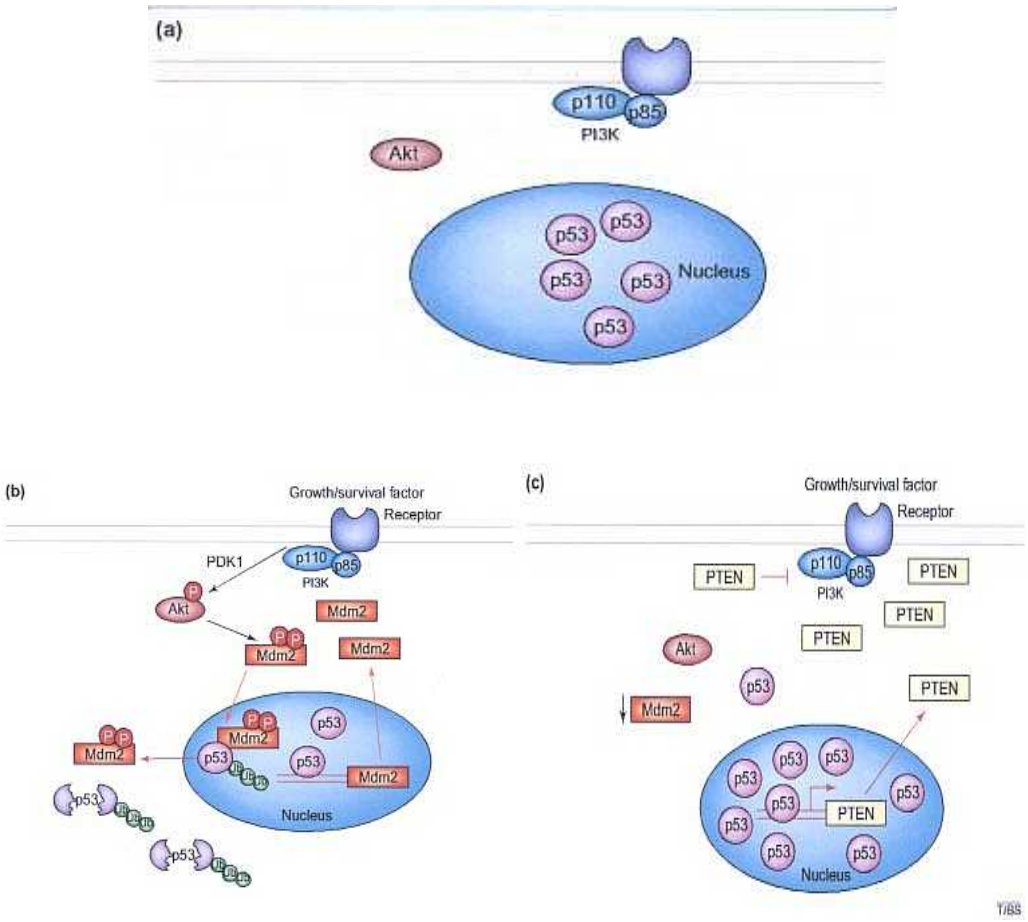


Figura 4- Desenho esquemático da rede de interligação do PTEN, P53 e a via PI3K/AKT – MAYO, L.D.; DONNER, D.B. *The PTEN, Mdm2, P53 Tumor Suppressor-oncoprotein network*. **Trends in Biochemical Sciences**; 27(9) :465, 2002.

A capacidade da molécula PTEN de bloquear a progressão de G1 tem sido sugerida através da via do P53 e da regulação positiva do P27 (MILLS et al., 2001; AN et al., 2002). A apoptose é mediada por diversas moléculas como a AKT, BAD, p70S6k e GSKα/β (MILLS et al., 2001).

Estudos imunoistoquímicos mostram que a distribuição celular do PTEN varia conforme o tecido. Na maioria das células epiteliais como pele, cólon, mama e próstata sua marcação ocorre predominantemente no citoplasma, já em neurônios, fibroblastos, tecidos

tireoidiano e da medula adrenal sua expressão é mais observada no núcleo (SULIS e PARSONS, 2003).

Estudos sobre o PTEN têm demonstrado mutações e/ou deleções em vários tipos de neoplasias humanas: glioblastomas, carcinomas da mama, do endométrio, da próstata, melanomas e carcinomas ovarianos (PARAMIO et al., 1999; MUTTER, 2001; XU et al., 2002; SHENG et al., 2002; PARSONS, 2004).

A inativação do PTEN é reconhecida precocemente nas neoplasias endometriais de padrão endometrióide, em contrapartida, nos carcinomas da próstata e nos melanomas representa um evento mais tardio na carcinogênese, predizendo um comportamento mais agressivo dessas neoplasias, especialmente revelado pelas metástases (MUTTER, 2001).

Impressões iniciais, baseadas em análise mutacional e perda de heterozigose (LOH) em carcinomas do ovário, apresentaram resultados expressivos para os adenocarcinomas endometrióides de 43% de LOH e 21% de mutações; 28% de LOH nos carcinomas serosos, sem evidências de mutação e nos mucosos não foram evidenciados achados significantes. Obata (1998) sugere, a partir dos dados acima expostos, a possibilidade de se tratarem de diferentes mecanismos de carcinogênese nos diferentes tipos histológicos.

Saito e colaboradores (2000) relatam que mutações do PTEN não são observadas somente nos carcinomas endometrióides (20%) mas, também em serosos (10%) e mucosos (25%) porém não nos ”borderline” .

Kurose e colaboradores (2001) observaram que dados imunoistoquímicos e da análise de LOH demonstravam em 77% dos tumores ovarianos uma perda parcial ou completa da expressão protéica do PTEN.

Portanto, alguns trabalhos sugerem que as alterações genômicas e protéicas do PTEN representem uma via particular da carcinogênese dos tumores endometrióides ovarianos. Já outros autores acreditam que possam representar uma via comum a outros tipos histológicos.

Frente às alterações estruturais e funcionais que ocorrem nessas moléculas durante a carcinogênese, os marcadores de índices de proliferação permitem uma quantificação do crescimento populacional celular frente à perda dos mecanismos controladores do ciclo celular. Dentre outros, o Ki67 produzido por Gerdes e colaboradores (1983), na Universidade de Kiel foi definido como um anticorpo monoclonal de camundongo, obtido através da 67ª placa de cultura em tecido. O antígeno reconhecido e reagente com o Ki67 é constituído por uma proteína não-histônica, com peso molecular entre 345 e 395 quilodaltons. Esse marcador apresenta expressão antigênica negativa nas fases G0 e precoce de G1 e positiva nas demais. A avaliação da proliferação celular em neoplasias humanas, através do emprego do Ki 67, tem sido comparada àquelas obtidas por métodos histológicos convencionais de rotina como índice mitótico (GERDES, 1984).

Portanto, diferentes estudos têm sido realizados com marcadores de controle do ciclo celular (p53 e PTEN) e de proliferação (Ki67) voltados para a elucidação de vias de carcinogênese, mecanismos de resistência a drogas e como fatores prognósticos em câncer de ovário. O presente estudo visa avaliar a marcação imunoistoquímica do p53, PTEN e Ki67 relacionando a dados morfológicos (tipos e graus histológicos), aspectos clínicos (idade, estádio da doença e diâmetro tumoral) e a processos oncogênicos como meio adjuvante na caracterização dos carcinomas primários do ovário.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar a expressão do p53, PTEN e Ki67 relacionando a dados morfológicos, aspectos clínicos e a processos patogenéticos como meio adjuvante na caracterização dos carcinomas primários do ovário.

2.2- Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão dos marcadores PTEN e p53 nos diferentes tipos e graus histológicos dos carcinomas ovarianos.

2. Comparar os resultados obtidos pelos marcadores PTEN e p53 com a expressão do Ki67, o maior diâmetro tumoral, idade das pacientes e estádio da doença.

3. Verificar se há correlação entre a expressão dos marcadores PTEN e p53.

4. Analisar se as expressões dos marcadores (PTEN/p53), os dados morfológicos e clínicos obtidos no estudo favorecem vias de carcinogênese comuns ou divergentes.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostra

Foram avaliados 70 carcinomas, produtos de pan-histerectomias, provenientes do Centro de Atenção à Saúde da Mulher (CAISM/Unicamp) sendo 26 carcinomas serosos, 27 endometrióides e 17 mucosos, previamente fixados em formaldeído a 10% tamponado, arquivados em blocos de parafina no Departamento de Anatomia Patológica, FCM, Unicamp, do período de 1992 a 2003.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Neoplasias malignas epiteliais serosas, endometrióides e mucinosas primárias do ovário em estádios I a IV (FIGO, 1988).

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Biópsias não fixadas em formalina a 10%, tamponada.
- Presença de neoplasia maligna concomitante de qualquer sítio primário.
- Biópsias com representação histológica inferior a 1 bloco para cada 1-2 cm de diâmetro de tumor.
- Bilateralidade nos carcinomas mucosos.
- Biópsias nas quais não haja concordância diagnóstica na reclassificação morfológica.
- Biópsias de tumores não epiteliais ou epiteliais não mucinosos, serosos ou endometrióides do ovário.

3.2- Estudo morfológico

Foram avaliadas as lâminas utilizadas na rotina diagnóstica do Departamento de Anatomia Patológica, FCM, Unicamp, constituídas por múltiplas secções de tecido ovariano neoplásico, em cortes de 4 m, coradas pela hematoxilina-eosina.

3.3- Dados clínicos

Os dados clínicos (idade, estádio, antecedentes oncológicos) foram coletados a partir dos prontuários médicos arquivados no SAME do Centro de Atenção Integrado à Saúde da Mulher (CAISM). O maior diâmetro tumoral foi obtido da descrição macroscópica dos laudos de patologia cirúrgica do Departamento de Anatomia Patológica/HC/Unicamp.

PROCESSAMENTO DO MATERIAL

3.4- Marcadores Imunoistoquímicos (p53, PTEN e Ki67)

As reações de marcação com anticorpos foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica, unidade do Centro de Atenção Integrado à Saúde da Mulher (CAISM), Unicamp.

As reações foram processadas em cortes de parafina, segundo a técnica do Complexo Avitina-Biotina Peroxidase (ABC) com os anticorpos : Ki67(Ki S5/ DAKO – código M 7187-1), p53 (DO-7/ DAKO – código M 7001-1) e PTEN (Mx PTEN/MMAC 1/ LABVISION – código MS 1601-S) e coradas pela Diaminobenzidina (DAB). A positividade dos marcadores p53 e Ki67 é observada no núcleo e do PTEN no citoplasma, de coloração acastanhada.

Lâminas-controle com antigenicidade positiva reconhecida para cada um dos marcadores foram avaliadas para garantir a eficácia da reação de cada lote de lâminas corado (a saber: controle positivo para o p53 – carcinoma ductal de mama; controle PTEN – carcinoma de próstata; Ki67 – centros germinativos de gânglios linfóides). Controles negativos foram também processados.

3.5- Reações de Imunoperoxidase

Etapa I: Desparafinização, recuperação antigênica, incubação dos marcadores

Foram realizados cortes histológicos de 4 m de espessura a serem submetidos a desparafinização em banho com xilol I em estufa a 110° C por 30 minutos. Realizados subseqüentes banhos em temperatura ambiente com xilóis II e III.

As secções foram hidratadas com álcoois nas respectivas concentrações 99%, 80% e 50% (várias lavagens).

Sucessivas lavagens com água corrente e destilada foram realizadas.

O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi obtido através de 3 banhos de 3 minutos cada com água oxigenada a 10%, seguida de nova lavagem em águas corrente e destilada.

A recuperação antigênica foi processada em panela a vapor por 30 minutos, a 95° C, com tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, para o anticorpo PTEN e tampão de EDTA, pH 8,9, para os marcadores p53 e Ki67.

Utilizados os anticorpos primários específicos com diluições de 1:50 para o PTEN e Ki67 e de 1:100 para o p53. Incubados em câmara úmida por 30 minutos a 37° C e colocados em geladeira *overnight*.

Etapa II: **Coloração e montagem das lâminas**

Retiradas as lâminas da incubação com os anticorpos primários foram procedidas 3 lavagens, no agitador, em PBS (tampão fosfato), de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

Secadas as lâminas com papel filtro foi pingado o Sistema Envision Peroxidase para os 3 anticorpos.

Subseqüentemente foram colocadas as lâminas em tampão PBS e preparado a diaminobenzidina (DAB): PBS pré-aquecido a 37° C. Dissolvido a DAB e acrescentada água oxigenada e o Dimetilsulfóxido (DMSO) nas seguintes proporções:

DAB..... 60 mg

PBS.....100 mg

H2O2(30%).....500 ml

DMSO..... 1 ml

Misturada a solução, foram colocadas as lâminas para corar por 5 minutos a 37° C.

Realizadas lavagens em águas corrente e destilada.

Contracorado com Hematoxilina de Mayer por 30 a 60 segundos. Nova lavagem em águas corrente e destilada.

Passado por segundos em água amoniacal. Repetida a lavagem em águas corrente e destilada.

As lâminas foram desidratadas por imersão em 3 álcoois etílicos em concentrações crescentes, diafanizadas em 3 banhos de xilol e montadas com lamínulas e resina de Entellan.

3.6- Análise das reações

A avaliação morfológica foi baseada na classificação para tumores epiteliais ovarianos da Organização Mundial de Saúde (OMS), na versão revisada de 1999, realizada por 2 patologistas com experiência em patologia ginecológica (doutoranda e orientadora).

Para a análise quantitativa das reações de imunoistoquímica foi utilizado o programa Imagelab 2000 – Sistema de Processamento e Análise de Imagem (Softium informática Ltda.), que se baseia na captura de imagens digitalizadas, subseqüente demarcação das células diaminobenzidina positivas (pontos brancos) e negativas (pontos pretos), em áreas de maior reação (*hot spot*), manualmente, contabilizando 500 células por marcador por caso (**Figura 5**) estabelecendo, desta forma, o percentual de células reagentes.

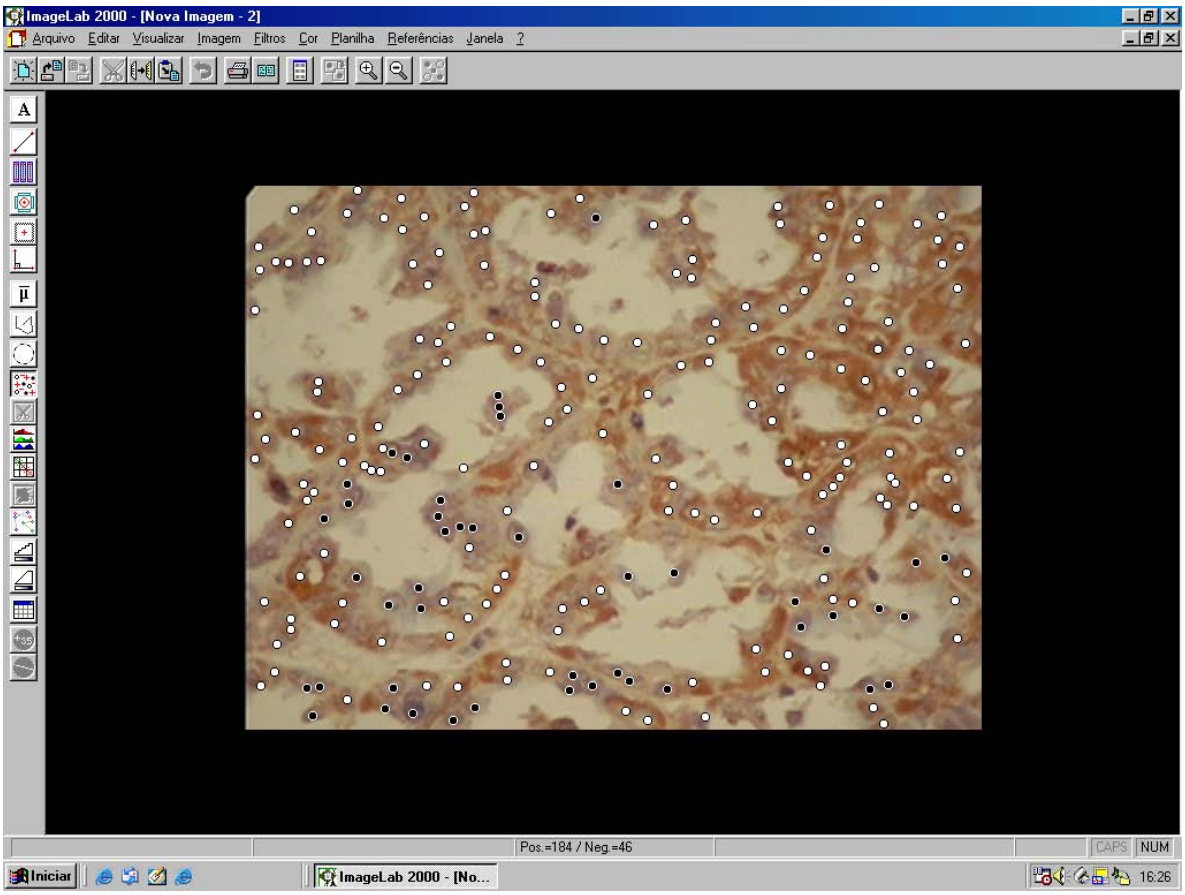


Figura 5- Carcinoma Seroso. Análise da reação imunoistoquímica para o PTEN (coloração citoplasmática) através do Imagelab 2000.

3.7- Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra foram utilizadas tabelas de freqüências para as variáveis categóricas e estatísticas descritivas para as variáveis descontínuas.

Para a comparação dos marcadores entre as classes de variáveis de dados clínicos foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis, se o número de grupos for maior do que dois (CONOVER, 1971).

Para verificar a existência de correlação (associação linear) entre as variáveis estudadas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente assume valores de -1 a +1, quanto mais próximo de zero menos correlacionadas são as variáveis e quanto mais próximos de 1 ou -1, mais correlacionadas são as variáveis (CONOVER, 1971).

Para análise multivariada dos marcadores em função dos fatores: tipo histológico/grau/estádio foi utilizada a regressão logística (HOSMER e LEMESHOW, 1989).

O nível de significância adotado foi de 5% ou $p \leq 0.05$.

Para a análise estatística foram utilizados 2 programas computacionais:

- *SAS System for Windows (Statistical Analysis System),* versão 8.2; *SAS institute Inc, 1999-2000, Cary,NC, USA*.
- *Microcal Origin,* versão 5.0; *Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA*.

3.8- Aspectos éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas homologou em 11 de dezembro de 2001 o parecer número 324/2001, referente à aprovação sem restrições do protocolo de pesquisa acima descrito.

Foram respeitados os princípios da declaração de Helsinque (*WORLD MEDICAL ASSOCIATION*, 1996) cumprindo-se todas as recomendações do *Guiding Medical Doctors in Biomedical Research involving Human Subjects*, mantendo-se em sigilo a identidade das pacientes, cujos dados foram identificados apenas pelos números de registro no projeto.

Os pesquisadores envolvidos nesse estudo apresentavam-se cientes das resoluções 196/96 e 215/97 do Conselho Nacional de Saúde, comprometendo-se com o seu cumprimento.

As análises que foram realizadas nesse estudo não implicaram em quaisquer modificações no tratamento da doença, bem como, em nenhuma forma de coleta de material adicional. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos às pacientes uma vez que todo o material biológico a ser analisado foi representado por produto do tratamento cirúrgico previamente indicado.

Tendo em vista tratar-se de pesquisa em material já fixado e arquivado, de pacientes que já haviam se submetido aos procedimentos diagnósticos e terapêuticos, aos quais foram asseguradas a confidencialidade e a privacidade dos dados coletados, não advindo nenhum risco adicional, foi considerado dispensável o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para esse estudo.

4- RESULTADOS

IDADE

As idades variaram de 24 a 78 anos com média e mediana ao redor dos 53 anos de idade (**Tabela 1**). Cinqüenta e sete por cento da casuística foi representada por mulheres acima dos 50 anos, portanto, um predomínio de casos em faixa etária de pós-menopausa (**Tabela 2**). Na **Tabela 3** vemos a distribuição da idade por tipo histológico.

Tabela 1- Distribuição geral da amostra em função a idade

Variável	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
Idade	70	53.39	12.43	24.00	53.50	78.00

Tabela 2- Distribuição da amostra acima e abaixo dos 50 anos

Idade	Freqüência	Percentual	Freqüência Acumulada
≤50	30	42.86	30
>50	40	57.14	70

Tabela 3- Distribuição dos tipos histológicos acima e abaixo dos 50 anos de idade

Idade	Mucoso	Endometrióide	Seroso
≤50	10	11	9
>50	7	16	17

ESTÁDIO DA DOENÇA

Houve predomínio dos estádios avançados, III e IV, que juntos contabilizaram 68% dos casos (**Tabela 4**).

Em estádio I notamos uma maior freqüência de carcinomas mucosos (8 de 14 casos) e um predomínio significante de carcinomas serosos em estádios avançados (III e IV) com ***p=0.0294*** (**Tabela 5**).

Em 7 casos não obtivemos informação sobre o estádio da doença.

Tabela 4- Distribuição geral da amostra por estádio

Estádio	Freqüência	Percentual	Freqüência Acumulada
I	19	30.16	19
II	1	1.59	20
III	39	61.90	59
IV	4	6.35	63

Tabela 5- Correlação dos tipos histológicos aos estádios da doença

Estádios	Mucoso	Endometrióide	Seroso
I e II	8	8	4
III e IV	6	16	21

p=0.0294 (Qui-Quadrado)

DIÂMETRO TUMORAL

O maior diâmetro tumoral variou de 3 a 30 cm, com média de 14.2cm e mediana de 12 cm (**Tabela 6**).

Os carcinomas mucosos apresentaram diâmetros significantemente maiores, com média de 21.0 cm, os endometrióides com média de 12,7 cm e os serosos com 11,2 cm, ***p=0.0012*** (**Tabela 7**).

Três casos (2 endometrióides e 1 seroso) não apresentaram a descrição de seus diâmetros tumorais nos relatórios anátomo-patológicos.

Tabela 6- Distribuição da amostra pelo diâmetro tumoral

Variável	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
Diâmetro	67	14.28	8.22	3.00	12.00	30.00

Tabela 7- Correlação do tipo histológico ao diâmetro tumoral

Tipo	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
Mucoso	17	21.07	8.28	3.00	25.00	30.00
Endometrióide	25	12.70	6.71	3.50	11.00	30.00
Seroso	25	11.24	7.09	3.20	9.00	28.00

p=0.0012 (Kruskal-Wallis)

TIPO HISTOLÓGICO

O menor percentual da amostra foi constituído pelo tipo histológico mucoso (17 tumores ou 24% da casuística), sendo 16 casos de padrão intestinal e 1 misto (endocervical-intestinal). Setenta e sete por cento desses carcinomas apresentaram áreas adjacentes de padrão morfológico compatível com adenoma / tumor *borderline* (13 casos). Dois carcinomas mucosos estavam associados a teratomas maduros.

A distribuição da amostra entre os tipos histológicos seroso e endometrióide foi quase igualitária (37% e 38%, respectivamente) (**Tabela 8**). Três dos 5 casos de carcinomas endometrióides bem diferenciados apresentaram associação com focos de endometriose.

Tabela 8- Distribuição da amostra por tipos histológicos

Tipo	Freqüência	Percentual	Freqüência Acumulada
Mucoso	17	24.29	44
Endometrióide	27	38.57	27
Seroso	26	37.14	70

GRAU HISTOLÓGICO

Obtivemos 26 casos bem diferenciados (G1), 35 moderadamente diferenciados (G2) e 9 carcinomas G3. A amostra totalizou mais de 62% dos casos de alto grau (G2 e G3) (**Tabela 9**).

Tabela 9- Distribuição da amostra por grau histológico

Grau	Freqüência	Percentual	Freqüência Acumulada
1	26	37.14	26
2	35	50.00	61
3	9	12.86	70

Avaliando o grau de diferenciação nos diferentes tipos histológicos obtivemos: 17 carcinomas mucosos bem diferenciados (G1); carcinomas serosos: 4 G1, 21 G2 e apenas 1 caso G3; carcinomas endometrióides: 5 G1, 14 G2 e 8 pouco diferenciados (G3) (**Tabela 10**).

Tabela 10- Distribuição dos graus pelos tipos histológicos

Grau	Mucoso	Endometrióide	Seroso
1	17	5	4
2	0	14	21
3	0	8	1

P53

O percentual de células reagentes para o p53 nos carcinomas do ovário, independente do tipo histológico, variou de 0 a 97.8% com média de 48.8% e desvio padrão de 40.7%. A positividade do p53 foi significantemente maior nas lesões de alto grau histológico (G2 e G3), com ***p = 0.032*,** conforme demonstrado na **Tabela 11**.

Tabela 11- Freqüência de expressão do P53 em relação ao grau histológico

Grau	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
1	26	0.30	0.37	0.00	0.004	0.95
2	35	0.57	0.38	0.00	0.78	0.95
3	9	0.72	0.41	0.00	0.90	0.98

p=0.032 (Kruskal-Wallis)

Relacionando os tipos e graus histológicos com a marcação para o p53 observamos que somente os carcinomas serosos apresentaram uma diferença estatisticamente significante (***p=0.0536***) entre os graus 1 e 2 (**Tabela 12**). Os endometrióides apresentaram uma tendência de significância com ***p= 0.0765*** (**Tabela 13**).

Tabela 12- Freqüência da expressão do P53 nos carcinomas serosos em seus diferentes graus histológicos

Grau	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
1	4	0.04	0.08	0.00	0.00	0.15
2	21	0.57	0.40	0.00	0.79	0.95
3	1	0.97	-	0.97	0.97	0.97

p=0.0536 (Mann-Whitney)

Tabela 13- Freqüência da expressão do P53 nos carcinomas endometrióides em seus diferentes graus histológicos

Grau	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
1	5	0.22	0.37	0.00	0.06	0.86
2	14	0.57	0.37	0.00	0.77	0.90
3	8	0.69	0.43	0.00	0.90	0.98

p=0.0765 (Mann-Whitney)

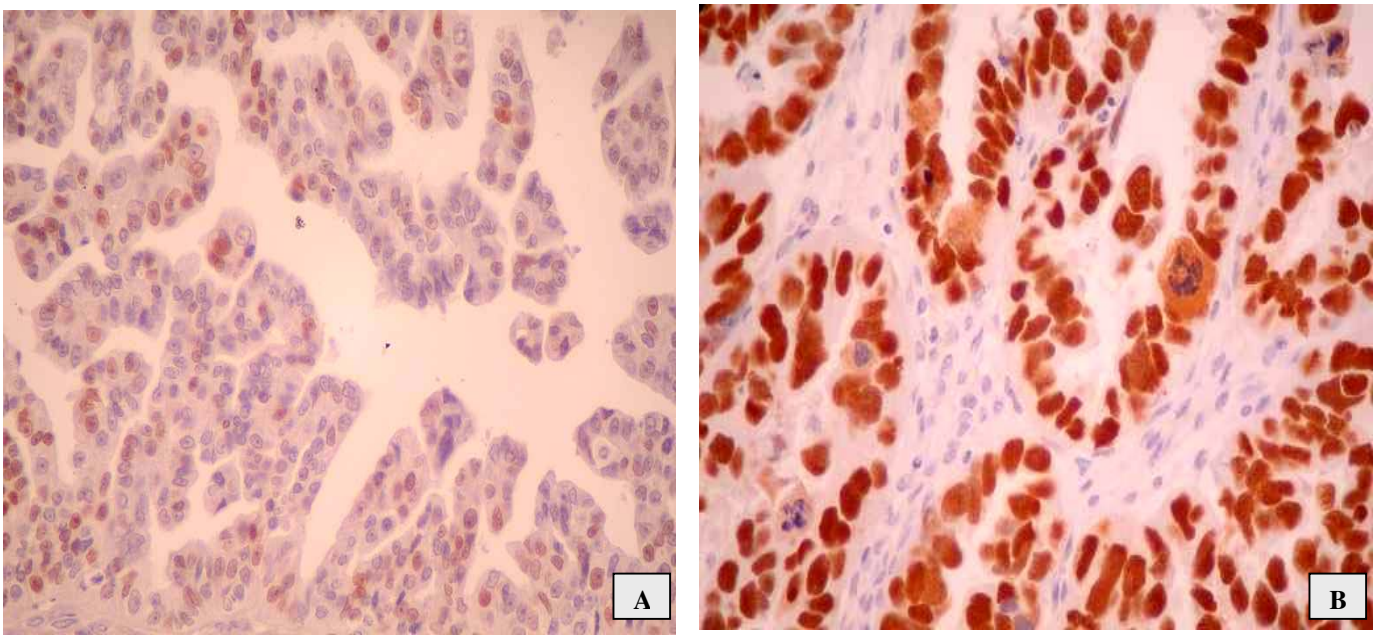


Figura 6- Carcinomas serosos. Notar a menor expressão do p53 nos carcinomas bem diferenciados (**A**) em relação aos pouco diferenciados (**B**).

Na avaliação realizada através de regressão logística multivariada foi observada significância estatística para o p53 relacionado ao grau histológico (***p=0.0274***), o que traduz que os carcinomas G3 têm um risco diferente de zero de serem p53 positivos, enquanto que os tumores G1 têm um maior risco de serem igual a zero para a expressão dessa proteína nos casos estudados (**Figura 6**).

Um aspecto curioso observado no grupo dos carcinomas mucosos foi a positividade para o p53 em áreas de fenótipo benigno/*borderline* de padrão intestinal (**Figura 7**).

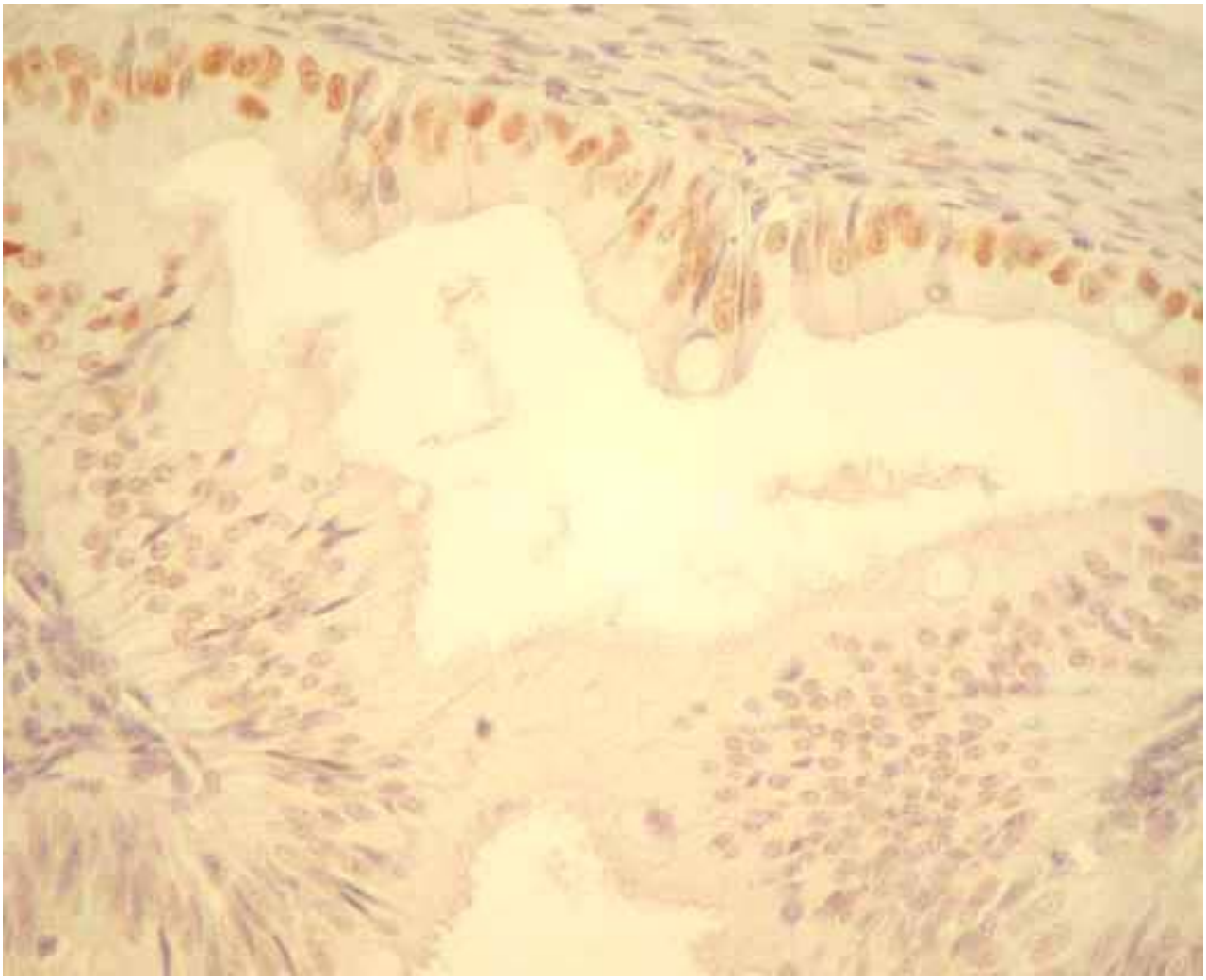


Figura 7- Positividade do p53 em áreas de fenótipo "benigno", padrão intestinal, associadas a carcinomas mucosos (400X).

PTEN

O PTEN foi expresso na maioria dos casos estudados, porém a falta de expressão citoplasmática do PTEN foi estatisticamente significante nos carcinomas bem diferenciados do tipo endometrióide como se nota na **Tabela 14 e Figura 8**.

Tabela 14- Correlação da expressão do PTEN com os tipos e graus histológicos

Tipo	Grau	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
	1	5	0.68	0.23	0.46	0.70	1.00
Endometrióide	**2**	14	0.97	0.12	0.56	1.00	1.00
	3	8	0.95	0.15	0.59	1.00	1.00
p=0.0033 (Mann-Whitney)							
	1	4	0.85	0.16	0.63	0.88	1.00
Seroso	**2**	21	0.88	0.19	0.36	1.00	1.00
	3	1	1.00	-	1.00	1.00	1.00
p=0.4183 (Mann-Whitney)							

Os carcinomas mucosos não foram avaliados devido a todos os 17 casos serem G1.

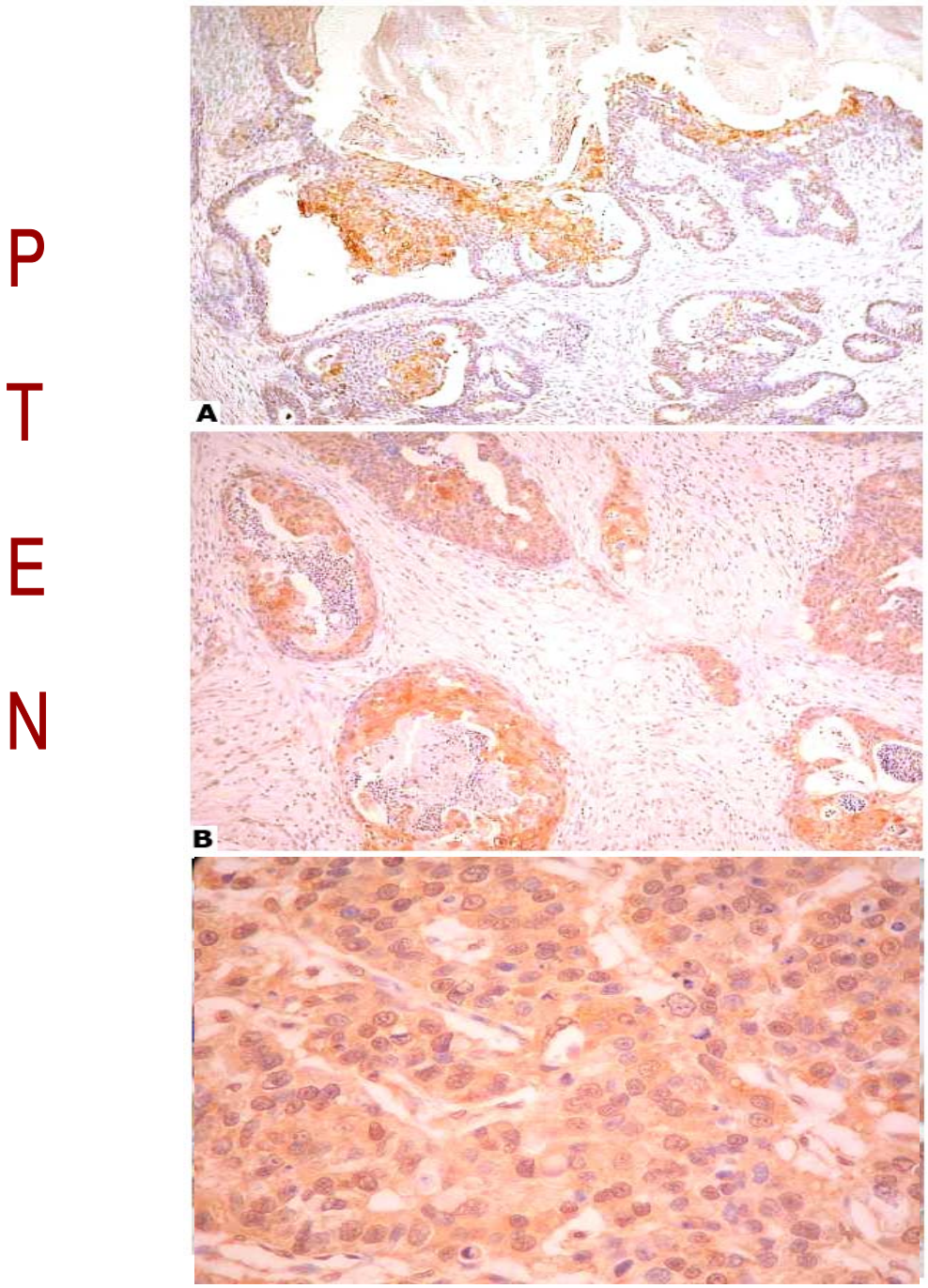


Figura 8- Carcinoma endometrióide e o PTEN: **A**) Ausência de expressão no carcinoma endometrióide G1 (áreas coradas correspondem a metaplasia escamosa); expressão do PTEN nos carcinomas endometrióides G2 (**B**) e G3 (**C**).

Ki67

Os carcinomas serosos e os tumores menos diferenciados (graus 2 e 3) apresentaram índices de proliferação significantemente superiores, como observado nas **tabelas 15** e **16**.

TABELA 15- Freqüência da expressão do Ki67 nos diferentes tipos histológicos

Tipo	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
Mucoso	17	0.14	0.07	0.05	0.11	0.33
Endometrióide	24	0.17	0.09	0.04	0.17	0.36
Seroso	25	0.26	0.14	0.03	0.26	0.52

p=0.0104 (Kruskal-Wallis)

Tabela 16- Relação da expressão do Ki67 com os graus histológicos

Graus	N	Média	DP	Min	Mediana	Max
1	26	0.14	0.08	0.04	0.12	0.33
2	31	0.24	0.14	0.03	0.25	0.52
3	9	0.22	0.10	0.06	0.25	0.36

p=0.0116 (Kruskal-Wallis)

Não foram observadas relações estatisticamente significantes entre os marcadores p53 X PTEN, p53 X Ki67, PTEN X Ki67. A correlação entre a expressão dos marcadores p53 e PTEN com os dados clínicos: idade das pacientes, diâmetro tumoral, estádio da doença não apresentou resultados estatisticamente significativos.

Portanto, observa-se que a amostra foi predominantemente representativa de mulheres acima dos 50 anos, em estádios avançados da doença, com tumores de alto grau histológico (G2 e 3). Os carcinomas mucosos constituíram a menor amostragem do trabalho, todos bem diferenciados, associados em 77% da amostra (13/17 casos) a áreas de padrão morfológico com gradiente adenoma-*borderline*, com os maiores diâmetros tumorais. Os carcinomas endometrióides apresentaram negatividade citoplasmática para o PTEN nas neoplasias bem diferenciadas adjacentes a focos de endometriose. Os carcinomas serosos foram os que demonstraram o maior índice de proliferação, com predomínio de estádios avançados (estádios III e IV) e uma maior expressão do p53 nos maiores graus histológicos.

5- DISCUSSÃO

CARCINOMAS MUCOSOS

Nos últimos anos a literatura tem favorecido a hipótese dos carcinomas mucosos do ovário serem considerados como entidades etiopatogênicas diferentes dos carcinomas não-mucosos, partindo de dados epidemiológicos que apontam para diferenças significativas dos fatores de risco para o desenvolvimento dessas neoplasias (RISCH et al., 1996; PURDIE et al., 2003; HESS et al., 2004).

O histórico familial, a paridade e o uso de anti-concepcionais (ACO) não representam fatores que favoreçam ou previnam a carcinogênese dos tumores do tipo mucoso, ao contrário do que se observa com os carcinomas serosos e endometrióides que têm no histórico familial o principal fator de risco independente para o desenvolvimento dessas neoplasias, a paridade a termo e o uso prolongado de ACO como fatores protetores. Já o tabagismo e a maior ingesta de gorduras saturadas favorecem a gênese dos tumores mucosos *borderline* e malignos (RISCH et al., 1996; PURDIE et al., 2003; HESS et al., 2004).

Bell (2005) acredita que a maioria dos carcinomas mucosos do ovário se origina a partir de lesões pré-existentes (adenoma-*borderline*) com alterações moleculares envolvendo a via RAS-RAF-MEK-ERK-MAP quinase.

Scully e colaboradores (1995) e Puls e colaboradores (1992) demonstraram a coexistência de epitélio mucoso de padrão benigno em carcinomas mucosos em 74 a 90% dos casos e de tumores *borderline* do tipo intestinal em 67 a 69%.

Além disso, vários estudos têm demonstrado uma freqüência de mutação do K-ras semelhante em tumores *borderline* e carcinomas mucosos, variando de 50 a 86% (MANDAI et al., 1998; HORIUCHI et al., 2003; BELL, 2005).

Um aspecto morfológico intrigante observado nos casos avaliados foi a presença de áreas de padrão intestinal benigno com positividade para o p53 (**figura 7**), uma vez que os cistadenomas mucosos apresentam revestimento predominantemente de padrão Mülleriano (endocervical) com negatividade para o p53 (WILLIAMS, 2000).

Zheng, em 1995, observou que os carcinomas ovarianos apresentavam freqüentemente cistos "benignos" adjacentes. A análise mutacional do p53 nesses cistos e nos carcinomas demonstraram que a mesma mutação estava presente em ambos, sugerindo a possibilidade de uma transição a partir de uma lesão pré-existente ou dos carcinomas apresentarem uma diferenciação com o fenótipo de benignidade.

Treze casos estudados (77% da amostra) apresentaram, em concordância com a literatura, áreas concomitantes de padrão adenoma/*borderline*.

Partindo do pressuposto que os tumores mucosos se originem de lesões pré-existentes, constituídos de forma heterogênea por áreas de padrão benigno/*borderline*/maligno, como se quantificar esses diferentes aspectos morfológicos e, portanto, classificar essas neoplasias?

Segundo o encontro de *experts* em patologia ginecológica ocorrido em agosto de 2003 em Bethesda (RONNETT et al.,2004), tumores benignos com menos de 10% de áreas *borderline* devem ser classificados como adenomas, somente informados os focos de atipia na descrição microscópica do laudo. Além disso, os componentes de baixo potencial de malignidade associados à adenomas são predominantemente do tipo intestinal.

Tumores classificados efetivamente como *borderline* do tipo intestinal são em sua vasta maioria estádio I com apenas cerca de 1% dos casos apresentando uma evolução desfavorável. Em virtude dessas estatísticas, alguns autores cogitam a possibilidade de utilizarem uma terminologia mais "benigna" para os tumores *borderline* do tipo intestinal como, por exemplo, "cistadenoma mucoso com atipia", caso seja confirmado o comportamento biológico benigno dessas lesões em novos trabalhos (RONNETT et al.,2004).

Com relação ao gradiente *borderline*/carcinoma temos que a diferenciação entre esses 2 grupos depende da identificação e quantificação da invasão estromal, o que não constitui tarefa fácil.

Hart e Norris (1973) propuseram que a despeito de ser ou não evidenciada invasão, os tumores mucosos com estratificação que excedesse a espessura de 3 camadas de células deveriam ser classificados como carcinomas, com base em análise de dados clínicos e histológicos, mostrando que metástases ocorriam sem invasão estromal demonstrável. Hart (1977) introduziu outros achados morfológicos como intensa atipia nuclear, arranjo cribriforme e projeções digitiformes de massas celulares sólidas, sem tecido de conjuntivo de sustentação, como critérios diagnósticos para carcinoma. Em 1999, a Organização Mundial de Saúde reconheceu os tumores mucosos *borderline* com atipia acentuada sem áreas de invasão, nos quais o epitélio de revestimento fosse francamente carcinomatoso, como uma variante designada por carcinoma intraepitelial. Interessante notar que a maioria desses carcinomas intraepiteliais são, a exemplo dos tumores *borderline*, neoplasias em estádio I e que os carcinomas intraepiteliais mucosos-estádios avançados devem levantar a suspeita de se estar frente a neoplasias de caráter metastático (RONNETT et al., 2004).

Além disso, tumores de baixo potencial maligno podem apresentar microinvasão caracterizada pela presença de 1 ou mais focos de células neoplásicas isoladas, em pequenos agrupamentos ou formando papilas infiltrando o estroma sem exceder 3 mm ou 10mm2 em suas maiores dimensões, podendo estar associada à invasão de vasos linfáticos, sem aparente alteração do prognóstico (BELL et al., 1990). Nayar e colaboradores , em 1996, descreveram como microinvasão focos de até 2mm de diâmetro máximo. Já Riopel e colaboradores (1999) definem como microinvasão áreas de menos de 5 mm. Nomura e Aizawa (2000) descrevem um caso com 4mm de invasão estromal, o qual apresentou recorrência e levou a óbito a paciente.

Portanto, ainda não há consenso na literatura quanto ao tamanho limítrofe dessas microinvasões que permitam a diferenciação com uma invasão estromal efetivamente carcinomatosa.

Também foi observado que os carcinomas mucosos apresentaram os maiores diâmetros tumorais, com média de 21 cm e mediana de 25 cm, todos bem diferenciados, com 8 de 14 casos em estádio I.

O grande diâmetro associado aos arranjos celular e arquitetural menos comprometidos (G1) apontam para um crescimento lento, correspondendo aos menores valores do Ki67 encontrados no trabalho (tabela16).

O diâmetro facilita a detecção dessas neoplasias em exames físico e ultrassonográfico, permitindo que o diagnóstico ocorra, frente ao comportamento mais indolente desses carcinomas, em estádios iniciais da doença.

O diâmetro é também um dos parâmetros utilizados na diferenciação entre tumor primário *versus* metastático, problema freqüente na rotina diagnóstica desse tipo histológico, sendo comumente menor que 10 cm, bilaterais e multinodulares nas metástases (JI et al.,2002).

Pelo acima exposto e como observado na literatura, os nossos resultados endossam a vertente de que os carcinomas mucosos primários do ovário representem o tipo histológico menos freqüente, o que eleva a probabilidade das lesões malignas mucinosas, neste sítio, se tratarem de metástases; estejam associados a áreas de padrão adenoma-*borderline*-carcinoma, falando a favor da possibilidade de se originarem a partir de lesões pré-existentes e apresentem os maiores diâmetros o que facilita sua detecção e diagnóstico.

CARCINOMAS ENDOMETRIÓIDES

Existem cerca de 20.000 genes expressos numa célula normal e aproximadamente 1% desse contingente diferentemente expresso em células neoplásicas. Um limitado número de genes tem sido descrito apresentando aumento ou diminuição dos níveis de expressão nos tumores ovarianos (ISMAIL et al., 2000).

Estudos utilizando hibridização genômica comparada têm revelado que a PIK3CA está amplificada em 40% dos carcinomas ovarianos. Esta região codifica a subunidade catalítica p110 do PI3K. Tem sido observado que a atividade da PI3K *in vitro* está aumentada quando a PIK3CA está amplificada, o que ocorre precocemente no

processo de transformação maligna (SHAYESTEH et al., 1999; SCHRAMI et al., 2003; ZHANG et al., 2003).

O PTEN tem papel na regulação negativa das funções promotoras do crescimento e proliferação celulares promovidas pela PI3K.

Estudando os mecanismos responsáveis pela inexpressão da proteína PTEN, alguns autores questionam o envolvimento desse gene na carcinogênese ovariana devido à falta de detecção de alterações estruturais, como mutações (TASHIRO et al., 1997; MAXWELL et al., 1998). Entretanto, Tashiro e colaboradores (1997) estudaram 12 carcinomas ovarianos todos do tipo seroso e Maxwell e colaboradores (1998) avaliaram 50 tumores sendo 37 serosos e os 13 restantes subdivididos entre os tipos mucoso, endometrióide, de células claras e indiferenciados. Portanto, seus resultados se basearam em escassa ou nenhuma amostragem de carcinomas endometrióides.

Frente as primeiras publicações desfavorecendo a participação do PTEN no processo de oncogênese ovariana, Mutter (MUTTER, 2001) sugeriu cautela nas análises sobre o PTEN afirmando que a perda de sua função no endométrio, mama, próstata, ovário e tumores melanocíticos é mais freqüente do que se pode adequadamente explicar por alterações genômicas isoladamente.

Kurose e colaboradores (KUROSE et al.,2001) observaram a inexpressão da proteína PTEN em 27% dos adenocarcinomas ovarianos. Entretanto, somente 8% dos casos de inativação do PTEN são explicados por perda de heterozigose e mutação, sugerindo que o silêncio transcricional por mecanismos epigenéticos (hipermetilação do DNA) possam representar um meio adicional de modificação da atividade dessa proteína.

Mecanismos epigenéticos têm sido estudados uma vez que o RNAm do PTEN tem uma região altamente conservada rica em GC 5` não transcrito, a qual pode ser alvo potencial de metilação do DNA (HAN et al.,2003).

Ainda a favor do PTEN estar relacionado à carcinogênese, observamos que a expressão de sua proteína selvagem em células cancerosas ovarianas suprime o crescimento celular tumoral (MINAGUCHI et al., 1999).

Os primeiros trabalhos que emergiram na literatura referentes ao gene e à proteína PTEN relacionados às neoplasias do trato genital feminino foram voltados para a topografia endometrial, observando-se mutações freqüentes nos carcinomas endometrióides (34 a 80% dos casos) e em hiperplasias atípicas (>50%) (MUTTER et al., 2000).

Os carcinomas endometrióides ovarianos avaliados em nosso estudo apresentaram o mesmo padrão de imunoexpressão do PTEN que o observado nos tumores esporádicos de endométrio: negatividade citoplasmática nos carcinomas do tipo I (endometrióides), de baixo grau, bem diferenciados. Esses dados falam a favor da possibilidade da inativação do PTEN ocorrer em fases precoces da oncogênese nesses sítios (FUJII et al., 2002; ORBO et al., 2003; BLACK et al., 2005).

Na revisão histológica dos nossos casos, observamos focos de endometriose adjacente em 3 dos 5 carcinomas endometrióides G 1 e a ausência de endometriose associada às neoplasias de graus 2 e 3.

Estudando a expressão do PTEN em 46 casos de endometriose, Martini e colaboradores (2002) observaram que 7 casos eram PTEN negativo, sendo 5 clinicamente classificados como estádio IV da endometriose e 2 associados a carcinomas endometrióides e à hipermetilação do gene *h*MLH1 (gene de reparo do DNA), sugerindo que a expressão protéica defectiva do PTEN seria uma ferramenta útil para se identificar endometrioses com elevado risco de transformação maligna.

Sato e colaboradores (2000) notaram a perda de heterozigose (LOH) e mutação do PTEN em cistos endometriais do ovário. Em 5 carcinomas endometrióides síncronos com endometriose, 3 tinham perda de heterozigose comuns, sugerindo a possibilidade de uma seqüência de progressão tumoral.

Erzen e colaboradores (2001) no trabalho *"Endometriosis-associated ovarian carcinoma (EAOC): an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study"* demonstraram que os carcinomas ovarianos associados a endometriose apresentavam seu diagnóstico em estádios iniciais da doença, com padrão morfológico que privilegiava os tipos endometrióide e de células claras, lesões predominantemente de baixo grau, com uma melhor sobrevida, sugerindo que essas neoplasias possam representar uma entidade particular.

Dinulescu e colaboradores (2005), em *"Role of K-ras and PTEN in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian câncer",* utilizaram modelos de engenharia genética em ratos ativando o oncogene Kras ou deletando o PTEN em células de superfície ovariana dando origem a lesões com morfologia glandular endometrióide; já a mutação concomitante do Kras e do PTEN induziu a formação de adenocarcinomas de padrão endometrióide, só que neste trabalho, ao contrário dos nossos resultados, os carcinomas apresentavam comportamento agressivo, com ampla disseminação tumoral.

A expressão do PTEN no endométrio varia ao longo do ciclo menstrual (MUTTER et al.,2000). Trabalhos com o estradiol em tecido endometrial demonstraram um aumento da fosforilação do PTEN, regulando negativamente a atividade dessa molécula 5-15 minutos após sua exposição, levando ao aumento da AKT, estimulando o crescimento e proliferação celulares. Em contrapartida, após 24 horas de tratamento com a progesterona há elevação dos níveis da proteína PTEN (GUZELOGLU-KAYISLI et al., 2003).

O fato de haver alterações cíclicas na expressão do PTEN, bem como, sua relação com o desenvolvimento de neoplasias em tecidos hormônio-sensíveis como próstata, mama, endométrio, ovário, a evidência de alterações dessa molécula em endometrioses (doença estrógeno dependente) e nos carcinomas endometriais do tipo I, relacionados a condições de hiperestrogenismo (SHERMAN, 1999; GIUDICE e KAO, 2004) falam a favor de uma possível relação do PTEN com os hormônios ou receptores esteróides.

Outro aspecto importante desse grupo histológico é a concomitância de carcinomas endometrióides endometriais e ovarianos, de difícil discernimento entre tumores primários *versus* metastáticos, com uma incidência de 34 a 40% em autópsias e de 5 a 15% em espécimes ressecados cirurgicamente (FUJII et al., 2002). Esse achado representa um desafio diagnóstico, uma vez que apresenta importância no estadiamento da doença, na terapêutica e no prognóstico dessas pacientes. Entretanto, do ponto de vista imunoistoquímico, o PTEN não nos permite discriminar entre sítios primários ou metastáticos.

Portanto, apesar de ainda pouco caracterizadas na literatura as alterações responsáveis pela expressão defectiva do PTEN, os nossos resultados favorecem sua participação precoce no processo de transformação maligna dos carcinomas bem diferenciados do tipo endometrióide, associados a áreas de endometriose.

CARCINOMAS SEROSOS

Os carcinomas serosos representam uma categoria especial dentro da patologia oncológica ovariana contabilizando de 40 a 50% dos tumores epiteliais malignos sendo, na sua vasta maioria, neoplasias de alto grau histológico com freqüentes mutações do P53 (LASSUS et al., 2003).

Os tumores serosos, avaliados nesse trabalho, apresentaram um predomínio de estádios avançados (estádios III e IV), uma maior freqüência de marcação da p53 nas lesões menos diferenciadas (graus 2 e 3) e índices de proliferação significativamente maiores que os encontrados noutros tipos histológicos. Discutiremos esses achados frente a algumas considerações sobre o p53.

O P53 foi descrito em 1979 sendo classificado como um proto-oncogene por cerca de 10 anos (VOGELSTEIN et al., 2000; HOFSETH et al., 2004). Esse gene foi, nos seus primórdios, clonado a partir de células neoplásicas humanas e de roedores, apresentando efeito oncogênico quando expresso. Somente no final dos anos 80 foi que os pesquisadores descobriram que estavam estudando formas mutantes do P53 (HOFSETH et al., 2004). Esse aspecto histórico do P53 é interessante porque demonstra que a expressão do gene mutado gera um produto protéico não obrigatoriamente inerte, mas que pode apresentar ganhos de função que favoreçam a carcinogênese.

A maioria das mutações do P53 são do tipo *missense* (81,4%) acarretando um aumento da meia-vida (GUALBERTO et al., 1998; LIU e GELMANN, 2002).

Preferencialmente essas mutações ocorrem em regiões que codificam, na proteína p53, sítios de ligação à molécula de DNA, o que acarreta a redução dos níveis de transcrição de outros genes como, por exemplo, as ligases E3 que participam do processo de ubiquitinação da p53 para degradação (LANE, 2004), portanto, diminuindo o ritmo de

metabolização da p53, ampliando sua meia-vida, acumulando-se no núcleo e viabilizando sua detecção por meio de reações imunoistoquímicas.

A proteína p53 comumente se acumula em carcinomas ovarianos, em maior freqüência nos tipos serosos, sendo uma ferramenta útil para marcar anormalidades genéticas (KUPRYJANCZYK et al., 1993).

Estudos imunoistoquímicos para a p53 apresentaram 75% de sensibilidade em predizer a presença de mutações, variando de 36 a 100% (LIU e GELMANN, 2002).

Kmet e colaboradores (2003), no trabalho "*A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potencial and invasive epithelial ovarian tumors",* avaliaram 526 tumores com 374 casos (71%) apresentando concordância entre a marcação imunoistoquímica e mutacional.

Singer e colaboradores (2005) consideram que, apesar do padrão imunoistoquímico da p53 não ser suficientemente sensível ou específico para predizer o *status* mutacional de um tumor, ele apresenta correlação. Esses mesmos autores observaram que o padrão imunoistoquímico da p53 sugere a evidência de mutação se o tumor é difuso e intensamente positivo. Já a positividade fraca e focal é quase excludente de mutação, não se podendo afastar a possibilidade de alteração gênica do P53 frente a sua negatividade imunoistoquímica.

Utilizamos em nosso estudo o clone DO-7 que reage tanto com a proteína em sua forma selvagem quanto com a mutada. Apesar de marcar as duas formas da proteína, algumas considerações sobre a inter-relação entre as p53 selvagem e mutante devem ser feitas.

A perda de heterozigose, ou seja, a perda do alelo que codifica a p53 selvagem é freqüentemente detectada em tumores (VARLEY et al., 1997; ERBER et al., 1998).

Para que a função da p53 seja exercida adequadamente, essa proteína deve se ligar ao DNA na sua forma tetramérica com todas as suas subunidades constituídas por formas selvagens. A presença de uma única subunidade mutada pode acarretar a perda da função da proteína p53; esse fenômeno é conhecido como efeito dominante negativo da p53

mutante. Vários são os mecanismos que geram esse efeito (MILNER e MEDCALF, 1991; OIJEN e SLOOTWEG, 2000).

Vários trabalhos na literatura têm indicado que certos tipos de mutações sofridas pelo P53 acarretam ganhos de função da proteína, ou seja, que a p53 mutante desempenhe funções que a p53 selvagem não exerce (MILNER e MEDCALF, 1991; DITTMER et al., 1993; GUALBERTO et al., 1998; LÁNYI et al., 1998; BLANDINO et al., 1999; OIJEN e SLOOTWEG, 2000).

Essas proteínas mutantes, dependendo da mutação sofrida, passam a apresentar um ganho de função com diferentes graus de oncogenicidade. Entre as funções "ganhas" pela proteína mutante estão: a repressão da p53 selvagem; a inibição da apoptose e da diferenciação, a diminuição da expressão da trombospondina 1 (molécula inibidora da angiogênese), a transativação do gene MDR1 (*multidrug resistance 1*), a estimulação do fator vascular de crescimento endotelial e do PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (GUALBERTO et al., 1998; LÁNYI et al., 1998; BLANDINO et al., 1999; OIJEN e SLOOTWEG, 2000; SIGAL e ROTTER, 2000).

A nossa amostra de carcinomas serosos apresentou 14 dos 26 casos com média de positividade de 86% das células, com coloração de forte intensidade, como observado na figura 6; 7 casos foram negativos para a p53 e somente 5 casos apresentaram positividade fraca e focal.

Reconhecendo que a expressão imunoistoquímica e a prevalência de mutações do P53 é maior nos carcinomas serosos, que as mutações são mais prevalentes nos carcinomas de estádios avançados (III e IV) e em tumores de maiores graus histológicos (2 e 3) no ovário (KMET et al., 2003) é possível sugerir que à medida que se acumule a proteína p53 nos carcinomas serosos, com difusa e intensa positividade imunoistoquímica, que o material marcado possa corresponder à proteína de natureza mutante predominantemente. Esse acúmulo pode estar relacionado a p53 com efeito dominante negativo ou com ganhos de função, resultando em neoplasias que apresentem perdas na sua capacidade de diferenciação, estímulos à proliferação celular e em estádios avançados como observado nos nossos casos.

6- CONCLUSÕES

1. A falta de expressão citoplasmática do PTEN apresentou significância estatística no grupo dos carcinomas endometrióides bem diferenciados.

   A maior expressão do p53 esteve associada aos maiores graus histológicos, em particular no grupo dos carcinomas serosos.

2. Não houve relação entre os marcadores p53 e PTEN e o diâmetro tumoral, idade, estádio da doença e a expressão do Ki67.

3. Não foi observada correlação entre as expressões dos marcadores p53 e PTEN na amostra avaliada.

4. Os achados favorecem diferentes vias de carcinogênese entre os carcinomas ovarianos dos tipos histológicos mucoso, endometrióide e seroso.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, H.; LEE, Y.; CHO, N.; SHIM, J.; KIM, J.; LEE, C. et al. Alteration of PTEN expression in endometrial carcinoma is associated with down-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27. **Histopathol**, 41: 437-45, 2002.

AOKI,Y.; KAWADA, N.; TANAKA, K. Early form of ovarian cancer originating in inclusion cysts. A Case Report. **J Rep Med,** 45(2): 159-61, 2000.

AUERSPERG, N.; OTA,T.; MITCHELL, G.W.E. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. **Int J Gynecol Cancer**, 12: 691-703, 2002.

BELL,D.A.; SCULLY, R.E. Ovarian Serous Borderline Tumors with stromal microinvasion: A report of 21 cases**. Hum Pathol,** 21(4): 397- 403,1990.

BELL, D.A. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. **Mod Pathol**, 18: S19-32, 2005.

BERCHUCK, A.; KOHLER, M.F.; HOPKINS, M.P.; HUMPHREY, P.A.; ROBBOY, S.J.; RODRIGUEZ, G.C. et al. Overexpression of p53 is not a feature of benign and early stage boderline epithelial ovarian tumors. **Gynecol Oncol**, 52: 232-36, 1994.

BLACK, D.; BOGOMOLNIY, F.; ROBSON, M.E.; OFFIT, K.; BARAKAT, R.R.; BOYD, J. Evaluation of germline PTEN mutations in endometrial cancer patients. **Gynecol Oncol**, 96: 21-24, 2005.

BLANDINO, G.; LEVINE, A.J.; OREN, M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of culture cells to chemotherapy. **Oncogene**, 18: 477-85, 1999.

BOSARI, S.; VIALE, G.; RADAELLI, U.; BOSSI, P.; BONOLDI, E.; COGGI, G. P53 accumulation in ovarian carcinomas and its prognostic implications. **Hum Pathol**, 24(11): 1175-79, 1993.

CAMPBELL, I.A.; RUSSELL, S.E.; CHOONG, D.Y.H.; MONTGOMERY, K.G.; CIAVARELLA, M.L.; HOOI, C.S.F. et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. **Cancer Res**, 64: 7678-81, 2004.

CAO, L.; LI, W.; KIM, S. Senescence, aging and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the BRCA1 full-length isoform. **Genes Develop**; 17: 201-13, 2003.

CHÈNE, P. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutant. **J M B**; 281: 205-09, 1998.

CHUAQUI, R.F.; COLE, K.A.; EMMERT-BUCK, M.; MERINO, M.J. Histopathology and molecular biology of ovarian epithelial tumors. **Ann Diag Pathol**; 2 (3): 195-207, 1998.

CLAUS, E.B.; SCHWARTZ P.E. Familial ovarian cancer. Update and clinical applications. **Cancer**, 76 (10): 1998-2003, 1995.

COLLARES-BUZATO, C.B. Junções celulares. In: CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001**. São Paulo: Manole Ltda, 2001.p. 57-76.

CONOVER, W.J. Practical nonparametric statistics. New York: John Wiley & Sons,1971.

DIETEL, M.; HAUPTMANN, S. Serous tumors of low malignant potencial of the ovary. 1. Diagnostic pathology. **Virchows Arch** ,436: 403-12, 2000.

DINULESCU, D.M.; INCE, T.A.; QUADE, B.J.; SHAFER, S.A.; CROWLEY, D.; JACKS, T. Role of K-ras and PTEN in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. **Nature Med**, 11(1): 63-70, 2005.

DUBEAU, L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? **Gynecol Oncol**; 72: 437-42, 1999.

EDMONDSON, R.J.; MONAGHAN, J.M. The epidemiology of ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer**; 11: 423-29, 2001.

ERZEN, M.; RAKAR, S.; KLANCAR, B. Endometriosis-associated ovarian carcinoma(EAOC): an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study**. Gynecol Oncol**; 83: 100-08, 2001.

FATHALLA, M.F.; Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia? **Lancet**; 17: 163, 1971.

FEARON, E.R.; VOLGESTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-67, 1990.

FEELEY, K.M.; WELLS, M. Precursor lesions of the ovarian epithelial malignancy. **Histopathol**,38: 87-95,2001.

FERNANDEZ, M.; ENG, C. The expanding role of PTEN in neoplasia: a molecule for all seasons? **Clin Cancer Res**, 8: 1695-98, 2002.

FREEMAN, D.J.; LI, A.G.; LI, H.; KERTESZ, N.; LESCHE, R.; WHALE, A.D. et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and independent mechanisms. **Cancer Cell**, 3: 117-30, 2003.

FUJII, H.; MATSUMOTO, T.; YOSHIDA, M.; FURUGEN, Y.; TAKAGAKI, T.; IWABUCHI, Y. et al. Genetics of synchronous uterine and ovarian endometrioid carcinoma: combined analyses of loss of heterozygosity, PTEN mutation and microsatellite instability. **Hum Pathol**, 33(4): 421-28, 2002.

GEORGESCU, M.; KIRSCH, K.; AKAGI, T.; SHISHIDO,T.; HANAFUSA, H. The tumor suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl terminal region. **PNAS**, 96: 10182-87, 1999.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of mouse monoclonal antiboby reactive with a Human Nuclear Antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**; 31: 13-20,1983.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human antigen defined by monoclonal antibody Ki67. **J Immunol**; 133:1710-15, 1984.

GILKS, C.B. Subclassification of ovarian surface epithelial tumors based on correlation of histologic and molecular pathology data. **Int J Gynecol Pathol**, 23: 200-05, 2004.

GIUDICE, L.C.; KAO, L.C. Endometriosis. **Lancet**, 364: 1789-99, 2004.

GUALBERTO, A.; ALDAPE, K.; KOZAKIEWICZ, K.; TLSTY, T.D. An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain of function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. **PNAS**, 95: 5166-71, 1998.

GUZELOGLU-KAYISLI, O.; KAYISLI, U.A.; AL-REJJAL, R.; ZHENG, W.; LULECI, G.; ARICI, A. Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium. **Clin Endocrinol & metabol**, 88 (10): 5017-26, 2003.

HAN, B.; DONG, Z.; LIU,Y.; LIU, Y.; CHEN, Q.; HASHIMOTO, K. Regulation of constitutive expression of mouse PTEN by the 5` untranslated region. **Oncogene,** 22: 5325-37, 2003.

HALL, P.A.; LEVISON, D.A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **J Clin Pathol**, 51: 1705-09, 1992.

HART, W.R.; NORRIS, H.J. Borderline and malignant mucinous tumors of the ovary: histologic criteria and clinical behavior. **Cancer,**31:1031-45,1973.

HART, W.R. Ovarian epithelial tumors of borderline malignancy (carcinomas of low malignant potential). **Hum Pathol,** 8 :541-9, 1977.

HENRIKSEN, R.; STRANG, P.; WILANDER, E.; BACKSTRÖM, T.; TRIBUKAIT, B.; ÖBERG, K. P53 expression in epithelial ovarian neoplasm: relationship to clinical and pathological parameters, Ki 67 expression and flow cytometry. **Gynecol Oncol**; 53: 301-06, 1994.

HESS, V.; A'HERN, R.; NASIRI,N.; KING,M.; BLAKE, P.R.;BARTON, D.P.J. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entty requiring specific treatment. **J Clin Oncol**, 22(6): 1040-44, 2004.

HOFSETH, L.J.; HUSSAIN,S.P.; HARRIS,C.C. P53 : 25 years after its discovery. **Trends in Pharm Sci**; 25: 177-81,2004.

HOLSCHNEIDER, C.H.; BEREK, S.J. Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors. **Semin Surg Oncol**; 19: 3-10,2000.

HOPKIN, K. The cell cycle and programmed cell death. In: ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002.p. 983-1023.

HORIUCHI, A.; ITOH, K.; SHIMIZU, M.; NAKAI, I.; YAMAZAKI, T.; KIMURA, K. et al. Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. **Gynecol Oncol**, 88: 309-17, 2003.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. John Wiley & Sons Inc. Nova Iorque, 1989.

HUTSON, R.; RAMSDALE, J.; WELLS, M. P53 protein expression in putative precursor lesions of epithelial ovarian cancer. **Histopathol**; 27:367-71,1995.

ISMAIL, R.S.; BALDWIN, R.L.; FANG, J.; BROWNING, D.; KARLAN, B.Y.; GASSON, J.C. et al. Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. **Cancer Res**; 60: 6744-49, 2000.

JI, H.; ISACSON, C.; SEIDMAN, J.D.; KURMAN, R.J.; RONNET, B.M. Cytokeratins 7 and 20, Dpc4, and MUC5AC in the distinction of metastatic mucinous carcinomas in the ovary from primary ovarian mucinous tumors: Dpc4 assists in identifying metastatic pancreatic carcinomas. **Int J Gynecol Pathol**, 21: 391-400, 2002.

KATSUBE, Y.; BERG, J.W.; SILVERBERG, S.G. Epidemiologic Pathology of ovarian tumors**. Int J Gynecol Pathol**,1: 3-16,1982.

KIYOKAWA, T. Alteration of p53 in ovarian cancer: its occurrence and maintenance in tumor progression. **Int J Gynecol Pathol**, 13: 311-18, 1994.

KLEIN, C.A. The biology and analysis of single disseminated tumour cell. **Trends in Cell Biology**, 10: 489-93, 2000.

KLEMI, P.J.; TAKAHASHI, S.; JOENSUU, H.; KIILHOLMA, P.; NARIMATSU, E.; MORI, M. Immunohistochemical Detection of P53 protein in borderline and malignant serous ovarian tumors. **Int J Gynecol Pathol,**13: 228-33,1994.

KMET, L.M.; COOK, L.S.; MAGLIOCCO, A.M. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. **Cancer**, 97(2): 389-404, 2003.

KOONINGS, P.P.; CAMPBELL, A.C.; MISHELL, D.R.; GRIMES, D.A. Relative frequency of primary ovarian neoplasm: A 10 year review. **Obstet Gynecol**,74: 921-26,1989.

KUPRYJANCZYK, J.; BELL, D.; YANDELL, D.W ; SCULLY, R.E.;THOR, A.D.;. P53 expression in ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. **A J C P**, 102: 671-76, 1993.

KUPRYJANCZYK, J.; BELL, D.; DIMEO, D.; BEAUCHAMP, R.;THOR, A.D.; YANDELL, D.W. P53 gene analysis of ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. **Hum Pathol**, 26(4): 387-92, 1995.

KUROSE, K.; ZOU, X.; ARAKI, T.; CANNISTRA, S.A.; MAHER, E.R.; ENG, C. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated AKT levels, but not associated with P27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. **Am J Pathol**, 158(6):2097-106, 2001.

LANE,D. P53 from pathway to therapy. **Carcinogenesis**; 25(7): 1077-81, 2004

LASSUS, H.; LEMINEN, A.; LUNDIN, J.; LETHTOVIRTA, P.; BUTZOW, R. Distinct subtypes of serous ovarian carcinoma identified by p53 determination. **Gynecol Oncol**, 91: 504-12, 2003.

LÁNYI, A.; DEB, D.; SEYMOUR, R.C.; LUDES-MEYERS, J.H.;SUBLER, M.A.; DEB, S. "Gain of function" phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid binding domain. **Oncogene**, 16: 3169-76, 1998.

LAX, S.F. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. **Virchows Arch** ; 444 : 213-23, 2004.

LEE, J.O.; YANG, H.; GEORGESCU, M.M. Crystal Struture of the PTEN Tumor Supressor: Implications for its Phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. **Cell**; 99: 323-34, 1999.

LI, R.; SUTPHIN, P.D.; SCHWARTZ, D.; MATAS, D.; ALMOG, N.; WOLKOWICZ, R. et al. Mutant p53 protein expression interfers with p53-independent apoptotic pathways. **Oncogene**, 16: 3269-77, 1998.

LIU, M.C.; GELMANN, E.P. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. **Sem Oncol**, 29(3): 246-57, 2002.

MAEHAMA, T.; DIXON, J.E. PTEN : a tumor suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. **Trends Cell Biol**, 9: 125-28, 1999.

MANDAI, M.; KONISHI, I.; KURODA, H.; KOMATSU, T.; YAMAMOTO, S.; NANBU, K. et al. Heterogenous distribution of Kras mutated epithelia in mucinous ovarian tumors with special reference to histopathology. **Hum Pathol**, 29(1): 34-40, 1998.

MARTINI, M.; CICCARONE, M.; GARGANESE, G.; MAGGIORE, C.; EVANGELISTA, A.; RAHIMI, S. et al. Possible involvement of hMLH1, p16 ink4alpha and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. **Int J Cancer**; 102: 398-406, 2002.

MAYO, D.L.; DONNER, D.B. The PTEN , Mdm2, P53 tumor suppressor-oncoprotein network. **Trends in Biochem Sci**, 27(9): 462-67, 2002.

MAXWELL, G.L.; RISINGER, J.I.; TONG, B.; SHAW, H.; BARRET, J.C.; BERCHUCK, A. Mutation of the PTEN tumor suppressor gene is not a feature of ovarian cancers. **Gynecol Oncol,** 70: 13-16, 1998.

MILLS, G.B.;LU, Y.; FANG, X.; WANG, H.; EDER, A.; MAO, M. et al. The role of genetic abnormalities of PTEN and the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathaway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. **Semin Oncol**, 5(supl 16): 125-41, 2001.

MILNER, J,; MEDCALF, E.A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild type p53 protein intothe mutant conformation. **Cell**, 65: 765-74, 1991.

MINAGUCHI, T.; MORI, T.; KANAMORI, Y.; MATSUSHIMA, M.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y. et al. Growth suppression of human ovarian cancer cells by adenovirus-mediated transfer of PTEN gene. **Cancer Res**, 59: 6063-67, 1999.

MORGAN, D. Cancer. In: ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science, 2002.p.1313-62.

MUTTER, G.L.; LIN, M.; FITZGERALD, J.T.; KUM, J.B.; ENG, C. Changes in endometrial PT EN expression throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol & metabol**, 85(6): 2334-38, 2000.

MUTTER, G.L. PTEN, a protean tumor supressor. **Am J Pathol**,158(6): 1895-98, 2001.

MYERS, M.P.; STOLAROV, J.P.; ENG, C.; LI, J.; WANG, S.I.; WIGLER, M.H. et al. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is dual-specificity phosphatase. **PNAS**, 94: 9052-57, 1997.

NAYAR, R.; SIRIAUNKGUL, S.; ROBBINS, K.M.; MCGOWAN, L.; GINZAN, S.; SILVERBERG, S.G. Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary. **Hum Pathol**, 27: 521-27, 1996.

NNENE, I.O.; NIETO, J.J.; CROW, J.C.; SUNDARESAN, M.; MACLEAN, A.B.; PERRET, C.W; HARDIMAN, P. Cell cycle and apoptotic proteins in relation to ovarian epithelial morfology. **Gynecol Oncol**; 92: 247-51, 2004.

NOMURA, K.; AIZAWA, S. Noninvasive, microinvasive, and invasive mucinous carcinomas of the ovary. A clinicopathologic analysis of 40 cases. **Cancer**, 89 (7): 1541-46, 2000.

OBATA, K.; MORLAND, S.J.; WATSON, R.H.; HITHCOCK, A.; CHENEVIX-TRENCH, G.;THOMAS, E.J. et al. Frequent PTEN/MMAC Mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. **Cancer Res**, 58: 2095-97, 1998.

OFFER, H.; EREZ, N.; ZURER, I.; TANG, X.; MILYAVSKY, M.; GOLDFINGER, N. Et al. The onset of p53 dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. **Carcinogenesis**, 23 (6): 1025-32, 2002.

OIJEN, M.G.C.T.; SLOOTWEG, P.J. Gain of function mutations in the tumor suppressor gene p53.**Clin Cancer Res**, 6: 2138-45, 2000.

OKADA, S.; TSUDA, H.; TAKARABE, T.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; HIROHASHI, S. Allelotype analysis of common epithelial ovarian cancers with special reference to comparison between clear cell adenocarcinoma with other histological types. **Jpn J Cancer Res**; 93: 798-806, 2002.

ORBO, A.; NILSEN, M.N.; ARNES, M.S.; PETTERSEN, I.; LARSEN, K. Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia. **Int J Gynecol Pathol**, 22: 141-48, 2003.

OTIS, C.N.; KREBS, P.A.; QUEZADO, M.M.; ALBUQUERQUE, A.; BRYANT, B.; JUAN, X.S. et al. Loss of heterozygosity in P53, BRCA 1, and strogen receptor genes and correlation to expression of p53 protein in ovarian epithelial tumors of different cell types and biological behavior. **Hum Pathol**; 31(2): 233-38, 2000.

PARAMIO, J.M.; NAVARRO, M.; SEGRELLES, C.; GÓMEZ-CASERO, E.; JORCANO, J.L. PTEN tumor suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. **Oncogene**, 18: 7462-68, 1999.

PARROT, J.A.; NILSSON, E.; MOSHER, R.; MAGRANE, G.; ALBERTSON, D.; PINKEL, D. et al. Stromal-epithelial interactions in he progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells. **Mol cell endocrinol**; 175: 29-39, 2001.

PARSONS, R. Human cancer, PTEN and PI-3 kinase pathway. **Semin Cell & Develop Biol**, 15: 171-76, 2004.

PERREN, A.; WENG, L.; BOAG, A.H.; ZIEBOLD, U.; THAKORE, K.; DAHIA, P.L.M. et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinoma of the breast. **Am J Pathol**, 155 (4): 1253-60, 1999.

PULS, L.E.; POWELL, D.E.; DEPRIEST, P.D. Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. **Gynecol Oncol**, 47: 53-57, 1992.

PURDIE, D.M.; WEBB, P.M.; SISKIND, V.; BAIN, C.J.; GREEN, A.C. The different etiologies of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancers. **Gynecol Oncol**, 88: S145-48, 2003.

RIOPEL, M.A.; RONNETT, B.M.; KURMAN, R.J. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors: atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial,microinvasive, invasive, and metastastic carcinomas. **Am J Surg Pathol,** 23: 1449-62, 1999.

RISCH, H.A.; MARRET, L.D.; JAIN, M.; HOWE, G.R. Differences in risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic type. Results of a case-control study. **Am J Epidemiol**, 144(4): 363-72, 1996.

RODRIGUEZ, M.; DUBEAU, L. Ovarian tumor development: insights fromovarian embryogenesis. **Eur J Gynaec Oncol**; 3: 175-83, 2001.

RONNET, B.M.; KAJDACSY-BALLA, A.; GILKS, B.; MERINO, M.J.; SILVA, E.; BRUCE, A.W. et al. Mucinous borderline ovarian tumors: points of general agreement and persistent controversies regarding nomenclature, diagnostic criteria, and behavior. **J Hum Pathol**, 35(8): 949-60, 2004.

RUSSEL, P. Surface epithelial-stromal tumors of the ovary. In: KURMAN, R.J. **Blaustein's Pathology of the female genital tract**. New York: Springer-Verlag, 1994.p. 705-82.

SAGARRA, R.A.M.; ANDRADE, L.A.L.A.; MARTINEZ, E.Z.; PINTO, G.A.; SYRJANEN, K.J.; DERCHAIN, S.F.M. P53 and Bcl-2 as prognostic predictos in epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer**, 12: 720-27, 2002.

SAITO, M.; OKAMOTO, A.; KOHNO,T.; TAKAKURA, S.; SHINOZAKI, H.; ISONISHI, S. et al. Allelic Imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer. **Int J Cancer**, 85: 160-65, 2000.

SALVESEN, H.B.; MACDONALD, N.; RYAN, A.; JACOBS, I.J.; LYNCH, E.D.; AKSLEN, L.A. et al. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. **Int J Cancer**, 91: 22-26, 2001.

SATO, N.; TSUNODA, H.; NISHIDA, M.; MORISHITA, Y.; TAKIMOTO, Y.; KUBO, T. et al. Loss of heterozigosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. **Cancer Res**, 60: 7052-56, 2000.

SCHRAMI, P.; SCHWERDTFEGER, G.; BURKHALTER, F.; RAGGI, A.; SCHMIDT, D.; RUFFALO, T. et al. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. **Am J Pathol**, 163(3): 985-92, 2003.

SCULLY, R.E.; BELL, D.A.; ABU-JAWDEH, G.M. Up date on early ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian tumors. In: SHARP, F.; MASON, P.; BLACKETT, T.; BEREK, J. **Ovarian Cancer 3**. Nova Iorque: Chapman & Hall Medical, 1995. p. 139-144.

SEIDMAN, J.D.; KURMAN, R.J. Ovarian Serous Borderline Tumors: A critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. **Hum Pathol,** 31(5): 539-57,2000.

SEIDMAN, J.D.; SOSLOW, R.A.; VANG, R.; BERMAN, J.J.; STOLER, M.H.; SHERMAN, M.E. et al. Borderline ovarian tumors: diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images. **J Hum Pathol**, 35(8): 918-33, 2004.

SHAW, P.A.; McLAUGHLIN, J.R.; ZWEEMER, R.P.; NAROD, S.A.; RISCH, H.; VERHEIJEN, R.H.M. et al. Histopathologic features of genetically determined ovarian cancer. **Int J Gynecol Pathol**, 21: 407-11, 2002.

SHAYESTEH, L.; LU, Y.; KUO, W.; BALDOCCHI, R.; GODFREY, T.; COLLINS, C. et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. **Nature Genet**, 21: 99-102, 1999.

SHENG, X.; KOUL, D.; LIU, J.; LIU, T.; YUNG, W.K.A. Promoter analysis of tumor suppressor gene PTEN: Identification of minimum promoter region. **Bioch & Biophys Res Commun**, 292: 422-26, 2002.

SHERMAN, M.E. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. **Modern Pathol**; 13(3): 295-308, 1999.

SHERMAN, M.E.; BERMAN,J.; BIRRER, M.J.; CHO, K.R.; ELLENSON, L.H.; GORSTEIN, F. et al. Current challenges and opportunities for research on borderline ovarian tumors. **J Hum Pathol**, 35(8): 961-70, 2004.

SHIMIZU, Y.; KAMOI, S.; AMADA, S.; HASUMI, K.; AKIYAMA, F.; SILVERBERG, S.G. Toward the development of universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. **Gynecol Oncol**, 70: 2-12, 1998.

SIGAL, A.; ROTTER, V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. **Cancer Res**, 60: 6788-93, 2000.

SILVA,E.G.; KURMAN,R.J.; RUSSELL,P.; SCULLY,R.E. Symposium: ovarian tumors of borderline malignancy. **Int J Gynecol Pathol,** 15:281-302,1996.

SILVERBERG, S.G. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. **Int J Gynecol Pathol**, 19: 7-15, 2000.

SILVERBERG, S.G.; BELL, D.A.; KURMAN, R.J.; SEIDMAN, J.D.; PRAT,J.; RONNET, B.M. et al. Borderline ovarian tumors: key points and workshop summary. **J Hum Pathol**, 35(8): 910-17, 2004.

SINAL, A.; ROTTER, V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome**. Cancer Res** ; 60: 6788-6, 2000.

SINGER, G.; STÖHR, R.; COPE, L.; DEHARI, R; HARTMANN, A.; CAO, D. et al. Patterns of P53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis. A mutational analysis with immunohistochemical correlation. **Am J Surg Pathol**, 29(2): 218-24, 2005.

STAMBOLIC, V.; MACPHERSON, D.; SAS, D.; LIN, Y.; SNOW, B.; JANG, Y. et al. Regulation of PTEN transcription by P53. **Molecular Cell,** 8: 317-25, 2001.

SULIS, M.L.; PARSONS, R. PTEN: from pathology to biology. **Trends Cell Biol**, 13(9): 478-83, 2003.

TAMURA, M.; GU, J.; MATSUMOTO, K.; AOTA, S.; PARSONS, R.; YAMADA, K.M. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. **Science**, 280:1614- 17, 1998.

TAMURA, M.; GU, J.; TAKINO, T.; YAMADA, K.M. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130 cas. **Cancer Res**,59: 442-49, 1999.

TASHIRO, H.; BLAZES, M.S.; WU,R.; CHO, K.R.; BOSE, S.; WANG, S.I. et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. **Cancer Res**; 57: 3935-40, 1997.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, 408: 307-10, 2000.

WAITE, K.A.; ENG, C. Protean Pten: form and function. **Am J Hum Genet,** 70: 829-44, 2002.

WELSH, J.B.; ZARRINKAR, P.P.; SAPINOSO, L.M.; KERN, S.G.; BEHLING, C.A.; MONK, B.J. et al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. **PNAS**; 98 (3): 1176-81, 2001.

WERNESS, B.A.; ELTABBAKH, G.H. Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features. **Int J Gynecol Pathol**, 20:48-63, 2001.

WILLIAMS, A.R.W. Pathological Assement of ovarian cancer.In: BARTLETT, J.M.S. **Ovarian Cancer –** Methods and protocols. New Jersey: Humana Press, 2000. p. 49-60.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION – Declaration of Helsinki (1964), 1996.

XU, Z.; STOKOE, D.; KANE, L.P.; WEISS, A. The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN promotes apoptosis and decrease cell size by inhibiting the PI3K/AKT pathway in Jurkat T cells. **Cell Growth & differentiation**, 13: 285-96, 2002.

ZHANG, L.; YANG, N.; KATSAROS, D.; HUANG, W.; PARK, J.; FRACCIOLI, S. The oncogene phosphatidylinositol 3' kinase catalytic subunit promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. **Cancer Res**, 63: 4225-31, 2003.

ZHENG, J.; BENEDICT, W.F.; XU, S.X.; KIM, T.M.; VELICESCU, M.; WAN, M. Et al. Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. **J Nat Cancer Inst**. 87: 1146-53, 1995.

8- ANEXOS

ANEXOS

Análise Descritiva das Variáveis

Tabela 1. Tabelas de freqüências e estatísticas descritivas.

IDADE

IDADE	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
<=50	30	42.86	30
>50	40	57.14	70

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
IDADE	70	53.39	12.43	24.00	53.50	78.00

ESTÁDIO

ESTADIO	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
I	19	30.16	19
II	1	1.59	20
III	39	61.90	59
IV	4	6.35	63

Frequency Missing = 7

DIÂMETRO

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
DIAMET	67	14.28	8.22	3.00	12.00	30.00

TIPO HISTOLÓGICO

HE	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
ENDOMETRIOIDE	27	38.57	27
MUCOSO	17	24.29	44
SEROSO	26	37.14	70

GRAU HISTOLÓGICO

GRAU	Frequency	Percent	Cumulative Frequency
BEM	26	37.14	26
MODERADO	35	50.00	61
POUCO	9	12.86	70

P 53

% POSITIVA

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
PP53	70	0.488	0.407	0.000	0.689	0.978

% NEGATIVA

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
NP53	70	0.512	0.407	0.022	0.311	1.000

PTEN

% POSITIVA

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
PPten	70	0.874	0.217	0.000	1.000	1.000

% NEGATIVA

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
Npten	70	0.126	0.217	0.000	0.000	1.000

KI-67

% POSITIVA

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
PKi67	66	0.194	0.119	0.028	0.178	0.519

% NEGATIVA

Variável	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
NKi67	66	0.806	0.119	0.481	0.822	0.972

Cruzamentos entre Variáveis

Tabela 2. **Cruzamentos e correlações dos marcadores com outras variáveis.**[53]

IDADE x **P53 POSITIVO** (TESTE DE MANN-WHITNEY - **p=0,0800**)

IDADE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
<=50	30	0.59	0.36	0.00	0.76	0.98
>50	40	0.41	0.43	0.00	0.17	0.97

IDADE x P53 NEGATIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - **p=0,0800**)

IDADE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
<=50	30	0.41	0.36	0.02	0.24	1.00
>50	40	0.59	0.43	0.03	0.83	1.00

ESTÁDIO x P53 POSITIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,1852)

ESTADIO	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
I e II	20	0.37	0.41	0.00	0.15	0.94
III e IV	43	0.52	0.40	0.00	0.76	0.98

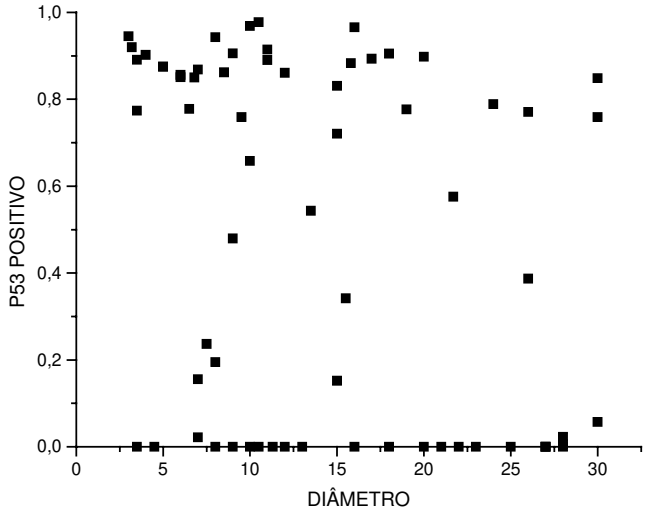
ESTÁDIO x P53 NEGATIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,1852)

ESTADIO	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
I e II	20	0.63	0.41	0.06	0.85	1.00
III e IV	43	0.48	0.40	0.02	0.24	1.00

DIÂMETRO x P53

		PP53
DIAMET	r=	***-0.34124***
	p=	***0.0047***
	n=	***67***

r= Coeficiente de correlação de Spearman
p= p-valor
n= tamanho da amostra



TIPO x P53 POSITIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - p=0,2693)

HE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
ENDOMETRIOIDE	27	0.54	0.40	0.00	0.78	0.98
MUCOSO	17	0.39	0.40	0.00	0.39	0.95
SEROSO	26	0.50	0.42	0.00	0.75	0.97

TIPO x P53 NEGATIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - p=0,2693)

HE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
ENDOMETRIOIDE	27	0.46	0.40	0.02	0.22	1.00
MUCOSO	17	0.61	0.40	0.05	0.61	1.00
SEROSO	26	0.50	0.42	0.03	0.25	1.00

GRAU x P53 POSITIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0032***)

GRAU	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
BEM	26	0.30	0.37	0.00	0.04	0.95
MODERADO	35	0.57	0.38	0.00	0.78	0.95
POUCO	9	0.72	0.41	0.00	0.90	0.98

DIFERENTES: POUCO E MODERADO / BEM E MODERADO / BEM E POUCO

Tabela 2 (cont). Cruzamentos e correlações dos marcadores com outras variáveis.

GRAU x P53 NEGATIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0032***)

GRAU	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
BEM	26	0.70	0.37	0.05	0.96	1.00
MODERADO	35	0.43	0.38	0.05	0.22	1.00
POUCO	9	0.28	0.41	0.02	0.10	1.00

DIFERENTES: POUCO E MODERADO / BEM E MODERADO / BEM E POUCO

PTEN

IDADE x **PTEN POSITIVO** (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,1131)

IDADE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
<=50	30	0.90	0.23	0.00	1.00	1.00
>50	40	0.85	0.21	0.39	1.00	1.00

IDADE x PTEN NEGATIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,1131)

IDADE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
<=50	30	0.10	0.23	0.00	0.00	1.00
>50	40	0.15	0.21	0.00	0.00	0.61

ESTÁDIO x PTEN POSITIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,6501)

ESTADIO	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
I e II	20	0.86	0.27	0.00	1.00	1.00
III e IV	43	0.87	0.19	0.36	1.00	1.00

ESTÁDIO x PTEN NEGATIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,6501)

ESTADIO	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
I e II	20	0.14	0.27	0.00	0.00	1.00
III e IV	43	0.13	0.19	0.00	0.00	0.64

DIÂMETRO x PTEN

	PPten
DIAMET	r= -0.10417
	p= 0.4015
	n= 67

r= Coeficiente de correlação de Spearman
p= p-valor
n= tamanho da amostra

TIPO x PTEN POSITIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - p=0,3538)

HE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
ENDOMETRIOIDE	27	0.91	0.18	0.46	1.00	1.00
MUCOSO	17	0.81	0.30	0.00	1.00	1.00
SEROSO	26	0.88	0.18	0.36	1.00	1.00

TIPO x PTEN NEGATIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - p=0,3538)

HE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
ENDOMETRIOIDE	27	0.09	0.18	0.00	0.00	0.54
MUCOSO	17	0.19	0.30	0.00	0.00	1.00
SEROSO	26	0.12	0.18	0.00	0.00	0.64

GRAU x PTEN POSITIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0460***)

GRAU	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
BEM	26	0.79	0.27	0.00	0.96	1.00
MODERADO	35	0.92	0.17	0.36	1.00	1.00
POUCO	9	0.95	0.14	0.59	1.00	1.00

DIFERENTES: BEM E POUCO

GRAU x PTEN NEGATIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0460***)

GRAU	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
BEM	26	0.21	0.27	0.00	0.04	1.00
MODERADO	35	0.08	0.17	0.00	0.00	0.64
POUCO	9	0.05	0.14	0.00	0.00	0.41

DIFERENTES: BEM E POUCO

Ki 67

IDADE x **KI67 POSITIVO** (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,6956)

IDADE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
<=50	27	0.18	0.11	0.03	0.19	0.48
>50	39	0.20	0.12	0.04	0.18	0.52

IDADE x KI67 NEGATIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,6956)

IDADE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
<=50	27	0.82	0.11	0.52	0.81	0.97
>50	39	0.80	0.12	0.48	0.82	0.96

ESTÁDIO x KI67 POSITIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,2335)

ESTADIO	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
I e II	19	0.16	0.10	0.04	0.16	0.38
III e IV	42	0.21	0.12	0.03	0.20	0.52

ESTÁDIO x KI67 NEGATIVO (TESTE DE MANN-WHITNEY - p=0,2335)

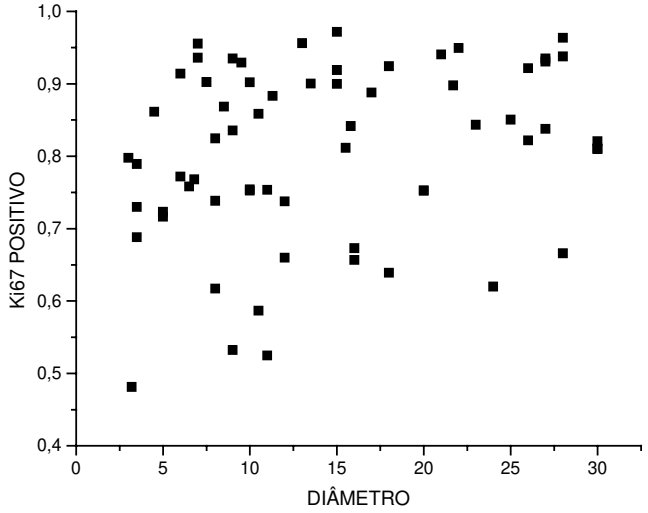
ESTADIO	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
I e II	19	0.84	0.10	0.62	0.84	0.96
III e IV	42	0.79	0.12	0.48	0.80	0.97

Tabela 2 (cont). Cruzamentos e correlações dos marcadores com outras variáveis.

DIÂMETRO x KI67

		PKi67
DIAMET	r=	***-0.24350***
	p=	***0.0525***
	n=	***64***

r= Coeficiente de correlação de Spearman
p= p-valor
n= tamanho da amostra



TIPO x KI67 POSITIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0104***)

HE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
ENDOMETRIOIDE	24	0.17	0.09	0.04	0.17	0.36
MUCOSO	17	0.14	0.07	0.05	0.11	0.33
SEROSO	25	0.26	0.14	0.03	0.26	0.52

DIFERENTES: MUCOSO E SEROSO / SEROSO E ENDOMETRIÓIDE

TIPO x KI67 NEGATIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0104***)

HE	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
ENDOMETRIOIDE	24	0.83	0.09	0.64	0.83	0.96
MUCOSO	17	0.86	0.07	0.67	0.89	0.95
SEROSO	25	0.74	0.14	0.48	0.74	0.97

DIFERENTES: MUCOSO E SEROSO / SEROSO E ENDOMETRIÓIDE

GRAU x KI67 POSITIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0116***)

GRAU	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
BEM	26	0.14	0.08	0.04	0.12	0.33
MODERADO	31	0.24	0.14	0.03	0.25	0.52
POUCO	9	0.22	0.10	0.06	0.25	0.36

DIFERENTES: BEM E POUCO / BEM E MODERADO

GRAU x KI67 NEGATIVO (TESTE DE KRUSKAL-WALLIS - ***p=0,0116***)

GRAU	N	Media	DP	Min	Mediana	Max
BEM	26	0.86	0.08	0.67	0.88	0.96
MODERADO	31	0.76	0.14	0.48	0.75	0.97
POUCO	9	0.78	0.10	0.64	0.75	0.94

DIFERENTES: BEM E POUCO / BEM E MODERADO

Coeficientes de Correlação de Spearman

Tabela 3. Correlações entre os marcadores e considerando os tipos histológicos.

	PP53	PPten
PPten	r= **0.38081** p= **0.0011** n= **70**	
PKi67	**0.41052** **0.0006** **66**	**0.28642** **0.0197** **66**

TIPO HISTOLÓGICO – ENDOMETRIÓIDE

	PP53	PPten
PPten	r= **0.51432** p= **0.0061** n= **27**	
PKi67	**0.47274** **0.0197** **24**	0.33778 0.1065 24

TIPO HISTOLÓGICO – MUCOSO (n=17)

	PP53	PPten
PPten	r= 0.28825 p= 0.2619	
PKi67	0.36825 0.1458	0.24664 0.3399

TIPO HISTOLÓGICO – SEROSO

	PP53	PPten
PPten	r= 0.26296 p= 0.1943 n= 26	
PKi67	0.35150 0.0849 25	**0.46495** **0.0192** **25**

* r= coeficiente de correlação de Spearman, p= nível de significância, n= tamanho da amostra.

Quadro 1 – Resultados das comparações entre tipos histológicos.

Idade

IDADE HE p-valor=0.6170 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	E	M	S	Total
<40	3 4.29 30.00 11.11	4 5.71 40.00 23.53	3 4.29 30.00 11.54	10 14.29
40-70	23 32.86 41.82 85.19	12 17.14 21.82 70.59	20 28.57 36.36 76.92	55 78.57
>70	1 1.43 20.00 3.70	1 1.43 20.00 5.88	3 4.29 60.00 11.54	5 7.14
Total	27	17	26	70

Estadio

ESTADIO HE p-valor=0.0294 (Qui-quadrado)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	E	M	S	Total
I e II	8 12.70 40.00 33.33	8 12.70 40.00 **57.14**	4 6.35 20.00 16.00	20 31.75
III e IV	16 25.40 37.21 66.67	6 9.52 13.95 42.86	21 33.33 48.84 **84.00**	43 68.25
Total	24 38.10	14 22.22	25 39.68	63 100.00

Frequency Missing = 7

38.57 24.29 37.14 100.00

Diâmetro

HE	N	Média	dp	Minimo	Mediana	Máximo
E	25	12.70	6.71	3.50	11.00	30.00
M	17	21.07	8.28	3.00	25.00	30.00
S	25	11.24	7.09	3.20	9.00	28.00

p-valor=**0.0012** (kruskal-Wallis)
diferenças: M e E; M e S

Grau

GRAU / Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	HE: E	M	S	Total
BEM	5	17	4	26
	7.14	24.29	5.71	37.14
	19.23	65.38	15.38	
	18.52	100.00	15.38	
MODERADO	14	0	21	35
	20.00	0.00	30.00	50.00
	40.00	0.00	60.00	
	51.85	0.00	80.77	
POUCO	8	0	1	9
	11.43	0.00	1.43	12.86
	88.89	0.00	11.11	
	29.63	0.00	3.85	
Total	27	17	26	70
	38.57	24.29	37.14	100.00

Quadro 2 – Comparações dos marcadores entre estadio e grau para o tipo histológico endometrióide.

ESTADIO	Marcador	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
I e II	PP53	8	0.29	0.36	0.00	0.15	0.90	
III e IV	PP53	16	0.61	0.41	0.00	0.86	0.98	0.1478
I e II	PPten	8	0.90	0.20	0.46	1.00	1.00	
III e IV	PPten	16	0.90	0.19	0.46	1.00	1.00	0.9243
I e II	PKi67	7	0.18	0.10	0.04	0.18	0.36	
III e IV	PKi67	16	0.17	0.09	0.04	0.17	0.34	0.9221

GRAU	Marcador	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor(Kruskal-Wallis)
BEM	PP53	5	0.22	0.37	0.00	0.06	0.86	
MODERADO	PP53	14	0.57	0.37	0.00	0.77	0.90	
POUCO	PP53	8	0.69	0.43	0.00	0.90	0.98	0.0765
BEM	PPten	5	0.68	0.23	0.46	0.70	1.00	
MODERADO	PPten	14	0.97	0.12	0.56	1.00	1.00	**0.0033**
POUCO	PPten	8	0.95	0.15	0.59	1.00	1.00	**(bem e mod; bem e pouco)**
BEM	PKi67	5	0.14	0.04	0.08	0.16	0.18	
MODERADO	PKi67	11	0.15	0.08	0.04	0.16	0.28	
POUCO	PKi67	8	0.21	0.11	0.06	0.23	0.36	0.4106

```
PP53      ESTADIO  p-valor=0.1032 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |I e II  |III e IV|  Total
---------+--------+--------+
 0       |      3 |      4 |      7
         |  12.50 |  16.67 |  29.17
         |  42.86 |  57.14 |
         |  37.50 |  25.00 |
---------+--------+--------+
<50%     |      3 |      1 |      4
         |  12.50 |   4.17 |  16.67
         |  75.00 |  25.00 |
         |  37.50 |   6.25 |
---------+--------+--------+
50-80    |      1 |      2 |      3
         |   4.17 |   8.33 |  12.50
         |  33.33 |  66.67 |
         |  12.50 |  12.50 |
---------+--------+--------+
>80%     |      1 |      9 |     10
         |   4.17 |  37.50 |  41.67
         |  10.00 |  90.00 |
         |  12.50 |  56.25 |
---------+--------+--------+
Total           8       16       24
            33.33    66.67   100.00

       Frequency Missing = 3
```

```
PP53      GRAU     p-valor=0.1614 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |BEM     |MODERADO|POUCO   |  Total
---------+--------+--------+--------+
 0       |      2 |      3 |      2 |      7
         |   7.41 |  11.11 |   7.41 |  25.93
         |  28.57 |  42.86 |  28.57 |
         |  40.00 |  21.43 |  25.00 |
---------+--------+--------+--------+
<50%     |      2 |      2 |      0 |      4
         |   7.41 |   7.41 |   0.00 |  14.81
         |  50.00 |  50.00 |   0.00 |
         |  40.00 |  14.29 |   0.00 |
---------+--------+--------+--------+
50-80    |      0 |      4 |      0 |      4
         |   0.00 |  14.81 |   0.00 |  14.81
         |   0.00 | 100.00 |   0.00 |
         |   0.00 |  28.57 |   0.00 |
---------+--------+--------+--------+
>80%     |      1 |      5 |      6 |     12
         |   3.70 |  18.52 |  22.22 |  44.44
         |   8.33 |  41.67 |  50.00 |
         |  20.00 |  35.71 |  75.00 |
---------+--------+--------+--------+
Total           5       14        8       27
            18.52    51.85    29.63   100.00
```

```
PKi67     ESTADIO   p-valor=0.5257 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |I e II  |III e IV|  Total
---------+--------+--------+
<=30%    |      6 |     15 |     21
         |  26.09 |  65.22 |  91.30
         |  28.57 |  71.43 |
         |  85.71 |  93.75 |
---------+--------+--------+
>30%     |      1 |      1 |      2
         |   4.35 |   4.35 |   8.70
         |  50.00 |  50.00 |
         |  14.29 |   6.25 |
---------+--------+--------+
Total           7       16       23
            30.43    69.57   100.00

       Frequency Missing = 4
```

```
PKi67     GRAU   p-valor=0.1377 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |BEM     |MODERADO|POUCO   |  Total
---------+--------+--------+--------+
<=30%    |      5 |     11 |      6 |     22
         |  20.83 |  45.83 |  25.00 |  91.67
         |  22.73 |  50.00 |  27.27 |
         | 100.00 | 100.00 |  75.00 |
---------+--------+--------+--------+
>30%     |      0 |      0 |      2 |      2
         |   0.00 |   0.00 |   8.33 |   8.33
         |   0.00 |   0.00 | 100.00 |
         |   0.00 |   0.00 |  25.00 |
---------+--------+--------+--------+
Total           5       11        8       24
            20.83    45.83    33.33   100.00

       Frequency Missing = 3
```

```
PPten     ESTADIO  p-valor=1.0000 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |I e II  |III e IV|  Total
---------+--------+--------+
<100%    |      2 |      4 |      6
         |   8.33 |  16.67 |  25.00
         |  33.33 |  66.67 |
         |  25.00 |  25.00 |
---------+--------+--------+
100%     |      6 |     12 |     18
         |  25.00 |  50.00 |  75.00
         |  33.33 |  66.67 |
         |  75.00 |  75.00 |
---------+--------+--------+
Total           8       16       24
            33.33    66.67   100.00

       Frequency Missing = 3
```

```
PPten     GRAU   p-valor=0.0069 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |BEM     |MODERADO|POUCO   |  Total
---------+--------+--------+--------+
<100%    |      4 |      1 |      1 |      6
         |  14.81 |   3.70 |   3.70 |  22.22
         |  66.67 |  16.67 |  16.67 |
         |  80.00 |   7.14 |  12.50 |
---------+--------+--------+--------+
100%     |      1 |     13 |      7 |     21
         |   3.70 |  48.15 |  25.93 |  77.78
         |   4.76 |  61.90 |  33.33 |
         |  20.00 |  92.86 |  87.50 |
---------+--------+--------+--------+
Total           5       14        8       27
            18.52    51.85    29.63   100.00
```

Quadro 3 - Comparações dos marcadores entre estadio e grau para o tipo histológico mucoso.

ESTADIO	Marcador	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
I e II	PP53	8	0.39	0.43	0.00	0.29	0.89	
III e IV	PP53	6	0.41	0.34	0.00	0.47	0.77	1.0000
I e II	PPten	8	0.77	0.38	0.00	1.00	1.00	
III e IV	PPten	6	0.86	0.22	0.51	1.00	1.00	0.7902
I e II	PKi67	8	0.12	0.05	0.06	0.11	0.19	
III e IV	PKi67	6	0.16	0.10	0.08	0.14	0.33	0.4908

PP53 ESTADIO p-valor=0.0596 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	I e II	III e IV	Total
0	4	1	5
	28.57	7.14	35.71
	80.00	20.00	
	50.00	16.67	
<50%	0	2	2
	0.00	14.29	14.29
	0.00	100.00	
	0.00	33.33	
50-80	1	3	4
	7.14	21.43	28.57
	25.00	75.00	
	12.50	50.00	
>80%	3	0	3
	21.43	0.00	21.43
	100.00	0.00	
	37.50	0.00	
Total	8	6	14
	57.14	42.86	100.00

Frequency Missing = 3

PKi67 ESTADIO p-valor=0.4286 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	I e II	III e IV	Total
<=30%	8	5	13
	57.14	35.71	92.86
	61.54	38.46	
	100.00	83.33	
>30%	0	1	1
	0.00	7.14	7.14
	0.00	100.00	
	0.00	16.67	
Total	8	6	14
	57.14	42.86	100.00

Frequency Missing = 3

PPten ESTADIO p-valor=1.0000 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	I e II	III e IV	Total
<100%	3	2	5
	21.43	14.29	35.71
	60.00	40.00	
	37.50	33.33	
100%	5	4	9
	35.71	28.57	64.29
	55.56	44.44	
	62.50	66.67	
Total	8	6	14
	57.14	42.86	100.00

Frequency Missing = 3

Quadro 4 - Comparações dos marcadores entre estadio e grau para o tipo histológico seroso.

ESTADIO	Marcador	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
I e II	PP53	4	0.46	0.53	0.00	0.45	0.94	
III e IV	PP53	21	0.49	0.42	0.00	0.72	0.97	0.8569
I e II	PPten	4	0.98	0.04	0.91	1.00	1.00	
III e IV	PPten	21	0.86	0.19	0.36	0.97	1.00	0.2602
I e II	PKi67	4	0.23	0.14	0.04	0.26	0.38	
III e IV	PKi67	20	0.25	0.14	0.03	0.26	0.52	0.9110

GRAU	Marcador	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (Mann-Whitney)
BEM	PP53	4	0.04	0.08	0.00	0.00	0.15	
MODERADO	PP53	21	0.57	0.40	0.00	0.79	0.95	0.0536

BEM	PPten	4	0.85	0.16	0.63	0.88	1.00	
MODERADO	PPten	21	0.88	0.19	0.36	1.00	1.00	0.4183
BEM	PKi67	4	0.13	0.13	0.04	0.08	0.33	
MODERADO	PKi67	20	0.28	0.14	0.03	0.27	0.52	0.1146
POUCO	PP53	1	0.97	.	0.97	0.97	0.97	
	PPten	1	1.00	.	1.00	1.00	1.00	
	PKi67	1	0.25	.	0.25	0.25	0.25	

PP53 ESTADIO p-valor=1.0000 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	I e II	III e IV	Total
0	1	6	7
	4.00	24.00	28.00
	14.29	85.71	
	25.00	28.57	
<50%	1	4	5
	4.00	16.00	20.00
	20.00	80.00	
	25.00	19.05	
50-80	0	3	3
	0.00	12.00	12.00
	0.00	100.00	
	0.00	14.29	
>80%	2	8	10
	8.00	32.00	40.00
	20.00	80.00	
	50.00	38.10	
Total	4	21	25
	16.00	84.00	100.00

Frequency Missing = 1

PP53 GRAU p-valor=0.1474 (Fisher)-pouco

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	BEM	MODERADO	POUCO	Total
0	2	5	0	7
	7.69	19.23	0.00	26.92
	28.57	71.43	0.00	
	50.00	23.81	0.00	
<50%	2	3	0	5
	7.69	11.54	0.00	19.23
	40.00	60.00	0.00	
	50.00	14.29	0.00	
50-80	0	3	0	3
	0.00	11.54	0.00	11.54
	0.00	100.00	0.00	
	0.00	14.29	0.00	
>80%	0	10	1	11
	0.00	38.46	3.85	42.31
	0.00	90.91	9.09	
	0.00	47.62	100.00	
Total	4	21	1	26
	15.38	80.77	3.85	100.00

PKi67 ESTADIO p-valor=1.0000 (Fisher)

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	I e II	III e IV	Total
<=30%	3	13	16
	12.50	54.17	66.67
	18.75	81.25	
	75.00	65.00	
>30%	1	7	8
	4.17	29.17	33.33
	12.50	87.50	
	25.00	35.00	
Total	4	20	24
	16.67	83.33	100.00

Frequency Missing = 2

PKi67 GRAU p-valor=1.0000 (Fisher)-pouco

Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	BEM	MODERADO	POUCO	Total
<=30%	3	12	1	16
	12.00	48.00	4.00	64.00
	18.75	75.00	6.25	
	75.00	60.00	100.00	
>30%	1	8	0	9
	4.00	32.00	0.00	36.00
	11.11	88.89	0.00	
	25.00	40.00	0.00	
Total	4	20	1	25
	16.00	80.00	4.00	100.00

Frequency Missing = 1

```
PPten     ESTADIO   p-valor=0.5930 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |I e II  |III e IV|  Total
---------+--------+--------+
<100%    |      1 |     11 |     12
         |   4.00 |  44.00 |  48.00
         |   8.33 |  91.67 |
         |  25.00 |  52.38 |
---------+--------+--------+
100%     |      3 |     10 |     13
         |  12.00 |  40.00 |  52.00
         |  23.08 |  76.92 |
         |  75.00 |  47.62 |
---------+--------+--------+
Total           4       21       25
            16.00    84.00   100.00

       Frequency Missing = 1
```

```
PPten     GRAU   p-valor=0.3217 (Fisher) -pouco
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |BEM     |MODERADO|POUCO   |  Total
---------+--------+--------+--------+
<100%    |      3 |      9 |      0 |     12
         |  11.54 |  34.62 |   0.00 |  46.15
         |  25.00 |  75.00 |   0.00 |
         |  75.00 |  42.86 |   0.00 |
---------+--------+--------+--------+
100%     |      1 |     12 |      1 |     14
         |   3.85 |  46.15 |   3.85 |  53.85
         |   7.14 |  85.71 |   7.14 |
         |  25.00 |  57.14 | 100.00 |
---------+--------+--------+--------+
Total           4       21        1       26
            15.38    80.77     3.85   100.00
```

Quadro 5 - Comparações entre estadios.

Idade

```
IDADE     ESTADIO   p-valor=0.2314 (Fisher)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |I e II  |III e IV|  Total
---------+--------+--------+
 <40     |      4 |      6 |     10
         |   6.35 |   9.52 |  15.87
         |  40.00 |  60.00 |
         |  20.00 |  13.95 |
---------+--------+--------+
40-70    |     13 |     35 |     48
         |  20.63 |  55.56 |  76.19
         |  27.08 |  72.92 |
         |  65.00 |  81.40 |
---------+--------+--------+
>70      |      3 |      2 |      5
         |   4.76 |   3.17 |   7.94
         |  60.00 |  40.00 |
         |  15.00 |   4.65 |
---------+--------+--------+
Total          20       43       63
            31.75    68.25   100.00

       Frequency Missing = 7
```

Grau

```
GRAU      ESTADIO  p-valor=0.0914 (Qui-quadrado)
Frequency|
Percent  |
Row Pct  |
Col Pct  |I e II  |III e IV|  Total
---------+--------+--------+
BEM      |     11 |     12 |     23
         |  17.46 |  19.05 |  36.51
         |  47.83 |  52.17 |
         |  55.00 |  27.91 |
---------+--------+--------+
MODERADO |      8 |     24 |     32
         |  12.70 |  38.10 |  50.79
         |  25.00 |  75.00 |
         |  40.00 |  55.81 |
---------+--------+--------+
POUCO    |      1 |      7 |      8
         |   1.59 |  11.11 |  12.70
         |  12.50 |  87.50 |
         |   5.00 |  16.28 |
---------+--------+--------+
Total          20       43       63
            31.75    68.25   100.00

       Frequency Missing = 7
```

Para a análise multivariada dos marcadores em função dos fatores: tipo histológico, grau e estadio, foi utilizada a regressão logística.

Quadro 6 - Análise de regressão logística multivariada para o p53.

Parâmetro		Estimativa	Erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercept	>80%	0.9536	0.9157	0.2977	-	
Intercept	<=80%	2.4764	0.9562	0.0096	-	
HE	E x S	-0.0930	0.5920	0.8751	0.911	0.286 ; 2.907
HE	M x S	0.3825	0.8864	0.6661	1.466	0.258 ; 8.329
GRAU	BEM x POUCO	-2.2740	1.0309	0.0274	0.103	0.014 ; 0.776
GRAU	MODERADO x POUCO	-1.2357	0.8899	0.1650	0.291	0.051 ; 1.663
ESTADIO	I e II x III e IV	-0.3066	0.5464	0.5747	0.736	0.252 ; 2.147

Quadro 7 – Análise de regressão logística multivariada para o pten.

Parâmetro		Estimativa	Erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercept		0.3120	1.3857	0.8219	-	
HE	E x S	1.4130	0.8724	0.1053	4.108	0.743; 22.714
HE	M x S	2.6723	1.2140	0.0277	14.473	1.340;156.290
GRAU	BEM x POUCO	-2.7043	1.4080	0.0548	0.067	0.004; 1.057
GRAU	MODERADO X POUCO	-0.0662	1.3432	0.9607	0.936	0.067; 13.019
ESTADIO	I e II x III e IV	0.5572	0.6961	0.4235	1.746	0.446; 6.831

Quadro 8 – Análise de regressão logística multivariada para o ki67.

Parâmetro		Estimativa	Erro padrão	p-valor	OR	IC95%
Intercept		-0.7973	1.3035	0.5408	-	
HE	E x S	2.2370	1.1589	0.0536	9.365	0.966 ; 90.775
HE	M x S	1.2069	1.5588	0.4388	3.343	0.158 ; 70.951
GRAU	BEM x POUCO	2.0397	1.6300	0.2108	7.688	0.315 ;187.621
GRAU	MODERADO x POUCO	1.4309	1.3072	0.2737	4.182	0.323 ; 54.215
ESTADIO	I e II x III e IV	0.2105	0.9324	0.8214	1.234	0.199 ; 7.675

Gráficos de Dispersão

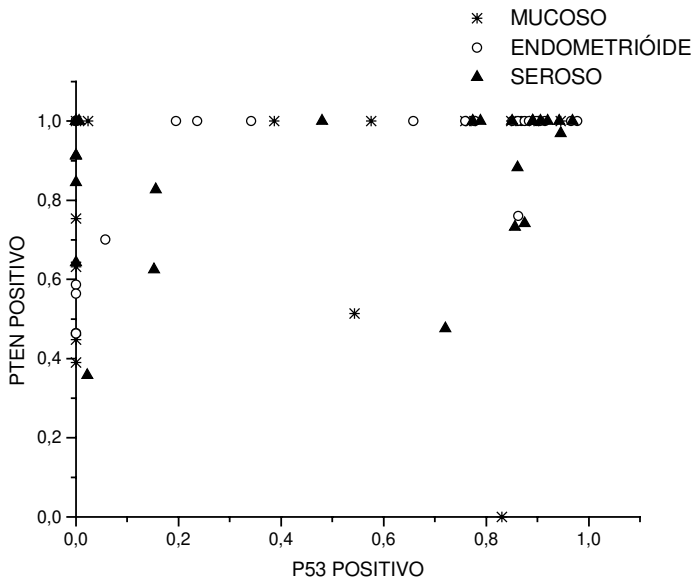
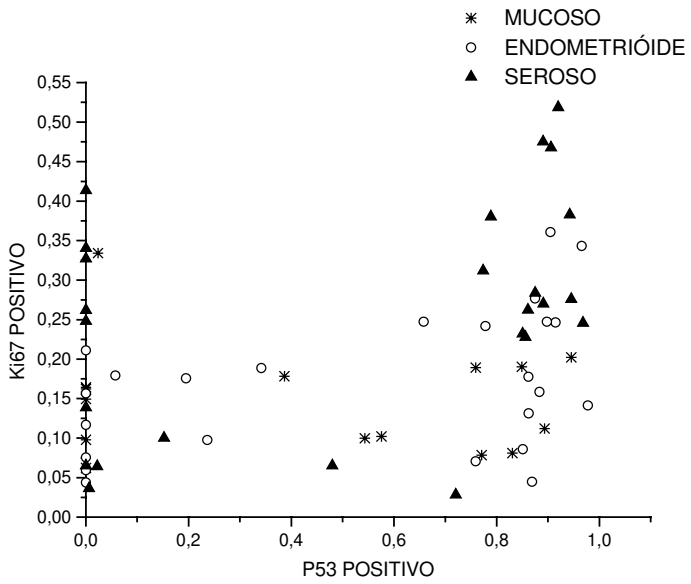
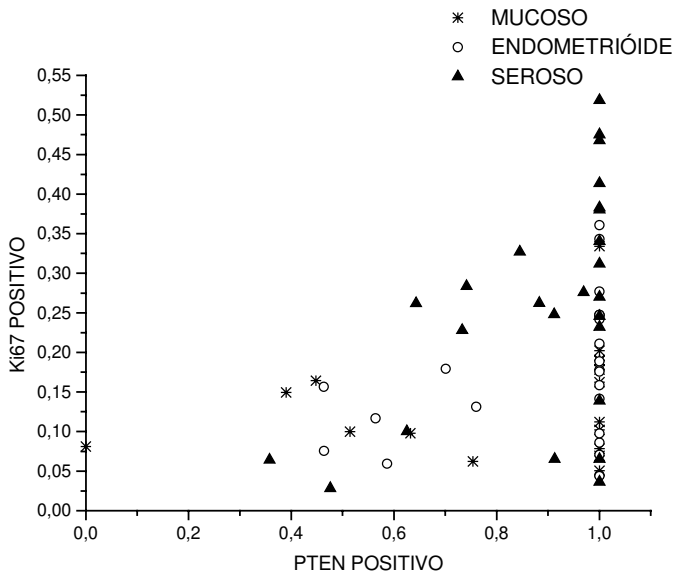



Tabela 4. Gráficos de Dispersão.