

FRANCES ROVERI MARQUES

***Expressão de N – e E – caderinas, α – e β – cateninas em
Tumores Epiteliais de Ovário***

CAMPINAS

2003

FRANCES ROVERI MARQUES

***Expressão de N – e E – caderinas, α – e β – cateninas em
Tumores Epiteliais de Ovário***

*Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, para obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas na área de
Ciências Biomédicas.*

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Aparecida Bottcher Luiz

Co-Orientadora: Profa. Dra. Liliana Aparecida Lucci De Ângelo Andrade

CAMPINAS

2003

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

M348e Marques, Frances Roveri
Expressão de N- e E-cadeninas, α e β -cateninas em tumores
epiteliais de ovário / Frances Roveri Marques. Campinas, SP : [s.n.],
2003.

Orientador: Fátima Böttcher Luiz
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunohistoquímica. 2. Moléculas de adesão celular. 3. Câncer.
I. Fátima Böttcher Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz

Membros:

1. Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz

2. Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

3. Prof. Dr. João Norberto Stavale

4. Profa. Dra. Laura Sterian Ward (Suplente)

5. Prof. Dr. Ismael D. C. Guerreiro (Suplente)

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/08/2003

*Aos meus pais, Rubens e Iracema, por toda
sua dedicação e apoio;*

*E em memória de madrinha Marta que,
esteja onde estiver, sei que também olha por
mim.*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Fátima Böttcher Luiz**, minha orientadora, pela confiança em meu trabalho e, principalmente, por ter me dado a chance de desenvolver não só este trabalho, mas também minha iniciação científica.

À **Profa. Dra. Liliana Lucci de Ângelo Andrade**, pela amizade, paciência, atenção e disponibilidade a mim sempre dispensadas.

Ao **Dr. Áureo T. Yamada, Dr. Paulo P. Joazeiro** e aos alunos (**Márcia e Júnior**) do Departamento de Histologia do IB, por terem me ensinado muito do que hoje eu sei sobre as técnicas e princípios da imunoistoquímica.

Ao **Dr. José Vassalo** e ao **Dr. Marcelo Alvarenga**, pelo incentivo e por terem possibilitado a realização dos ensaios práticos referentes a este estudo no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM.

Aos funcionários **Luiz e Darci** pela ajuda e companhia nas intermináveis buscas por lâminas e blocos nos arquivos do Dept. de Anatomia Patológica.

Aos funcionários **Gisele e Sérgio**, também do Laboratório de Patologia Experimental, no Núcleo de Medicina Experimental, por terem providenciado os cortes histológicos utilizados neste projeto.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Experimental: **Mariza, Cristiano, Ainá, Júlio, Eduardo, Felipe, Rose e D. Helena**, que me receberam muito bem em seu espaço de trabalho, onde realizei as reações de imunoistoquímica para este projeto, sempre com amizade, paciência e disposição para ajudar.

À estatística **Gislaine Carvasan** por toda a sua paciência para comigo e por sua participação, tão importante para a conclusão deste projeto.

Às meninas do Laboratório de Cultivo Celular e Citogenética: **Sandra, Cássia, Thaís, Vanessa, Alessandra e Raquel** que sempre se preocuparam comigo. E também aos funcionários **Alex e Rossana**, que sempre me ajudaram quando precisei.

À **Juliana Karina Ruiz Heinrich**, pelas muitas e importantes dicas sobre programas de computadores, leitura de lâminas, genética, sobre os tramites do mestrado e outros.

À SCPG/MED (**Marcinha**); à Secretaria do Departamento de Genética Médica (**Claudia**), por terem ouvido e respondido às minhas intermináveis dúvidas; sempre procurando me ajudar a resolver meus “rolos”.

À SCPG –**Tocoginecologia/FCM**, pelo apoio em momentos decisivos deste trabalho.

Ao **peçoal do SAME**, CAISM, pelas várias buscas aos tantos prontuários de pacientes, que foram necessários levantar para este trabalho.

Ao **peçoal do Centro de Computação**, FCM, que me forneceu a primeira listagem de casos de tumor de ovário. Sem esta, levaria uma “eternidade” para levantar o número de casos analisados neste trabalho.

Aos amigos que fiz durante este curso de mestrado, **Adão, Elisa Peixoto e Carolina Clemente**, por toda a força e auxílio a mim dedicados.

À minha grande amiga **Adriana**, por ter estado sempre presente quando precisei.

À minha irmã, **Patrícia**, pelas dicas e sugestões que ajudaram muito na realização deste projeto. E também as minhas tias “corujas”: **Adélia e Arlete**, por toda a reza e pensamento positivo.

Ao **CAPES/UNICAMP**, pela concessão da bolsa de mestrado.

Às **pacientes** que, anonimamente, possibilitaram a condução deste estudo.

*À Dra. Kazue Panetta, que tanto nos incentivou,
nosso agradecimento e singela homenagem.*

Frances Roveri Marques

Fátima Böttcher Luiz

Liliana Andrade

“... Be content with what you have got and make the best of it. Look on the bright side of things instead of the gloomy one.

(...)

“Be prepared” in this way, to live happy and to die happy – stick to your Scout promise always – even after you have ceased to be a boy – and God help you to do it.”

Baden Powell of Gilwell

	PÁG.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	19
Câncer de Ovário.....	20
Moléculas de Adesão Celular.....	21
Papel das Caderinas, Cateninas nos Processos de Invasão e Metástases do Câncer.....	21
Expressão das Caderinas e Cateninas em Tumores de Mama e Ovário.....	27
Abordagem Metodológica para Detecção das Caderinas e Cateninas – Imunoistoquímica.....	30
OBJETIVOS	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
Amostra.....	35
Métodos.....	36
Coleta e processamento do material.....	36
Reações Imunoistoquímicas.....	37
Leitura das Preparações.....	39
Acompanhamento dos sujeitos.....	40
Aspectos Éticos.....	40
Teste Estatístico.....	40

RESULTADOS	43
Expressão de E-caderina.....	45
Expressão de N-caderina.....	48
Expressão de β -catenina.....	51
Expressão de α -catenina.....	54
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	74

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
TABELA 1- Composição da amostra segundo o número de casos de neoplasias, os estádios clínicos e os ensaios realizados com os respectivos anticorpos para as cateninas e caderinas investigadas.....	35
TABELA 2- Procedência, clones e diluições dos anticorpos primários utilizados.....	38
TABELA 3- Distribuição da amostra segundo a classificação histopatológica dos tumores e estadiamento clínico.....	44
TABELA 4- Expressão de E-caderina segundo tumores malignos e benignos estágio tumoral ao diagnóstico, evolução do caso e tipos histológicos.....	46
TABELA 5- Expressão de N-caderina segundo tumores malignos e benignos estágio tumoral ao diagnóstico, evolução do caso e tipos histológicos.....	49
TABELA 6- Expressão de β -catenina segundo tumores malignos e benignos estágio tumoral ao diagnóstico, evolução do caso e tipos histológicos.....	52
TABELA 7- Expressão de α -catenina segundo tumores malignos e benignos estágio tumoral ao diagnóstico, evolução do caso e tipos histológicos.....	55

LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
FIGURA 1- Pâncreas normal expressando E-caderina (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	41
FIGURA 2- Fígado normal expressando N-caderina (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	41
FIGURA 3- Expressão da α -catenina em cisto benigno na superfície do ovário (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 200X.....	42
FIGURA 4- Epitélio de superfície (mesotélio) ovariano normal expressando β -catenina intracitoplasmática (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	42
FIGURA 5- Adenocarcinoma mucoso, estágio Ia, expressando E-caderina em citoplasma. Notar padrão de marcação basal, encontrado também em vários outros espécimes analisados. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	47
FIGURA 6- Adenocarcinoma endometrióide, estágio IIIc, intensamente positivo para E-caderina. Notar aspecto granular da marcação também observados para outros espécimes analisados. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	47
FIGURA 7- Adenoma seroso intensamente positivo para N-caderina. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	50
FIGURA 8- Adenocarcinoma seroso, estágio Ia, mostrando marcação citoplasmática para N-caderina. Intensidade da reação de fraca à moderada. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	50

FIGURA 9-	Adenocarcinoma endometrióide, estágio IIIc, marcação intensa para β -catenina; 100% das células observadas apresentam-se positivas. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	53
FIGURA 10-	Adenocarcinoma endometrióide, estágio Ia, mostrando marcação citoplasmática e nuclear para β -catenina. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	53
FIGURA 11-	Adenocarcinoma mucoso, estágio Ia, mostrando marcação citoplasmática moderada para α -catenina; 100% das células mostram-se positivas. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	56
FIGURA 12-	Adenocarcinoma seroso, estágio IIIC, mostrando marcação no citoplasma e na membrana para α -catenina. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.....	56

	PÁG.
ESQUEMA 1- O duplo papel da β -catenina, na adesão celular e na ativação da transcrição gênica: A β -catenina (B) e a Placoglobina (Pg) ligam-se à caderina e, via α -catenina, ligam-se ao citoesqueleto celular, formando a junção de adesão (AJ). Quando a via de sinalização Wnt esta inativa, as moléculas livres de β -catenina são recrutadas pelo complexo GSK3/APC/Axin e, após fosforilação, é degradada nos proteossomos 26S.	25



RESUMO

Mudanças no padrão de expressão das moléculas de adesão são observadas no desenvolvimento tumoral em diferentes tipos de câncer, estando relacionadas com invasão e metástase. O objetivo deste estudo foi analisar e comparar os padrões de expressão de α - e β -cateninas, E- e N-caderinas em tumores malignos e benignos do epitélio ovariano de superfície, visando estabelecer possíveis correlações entre a expressão destas moléculas, o estágio tumoral e a manifestação de metástases, nas neoplasias malignas. Preparações de imunistoquímica foram obtidas a partir de 88 biópsias (39 benignas e 49 malignas) incluídas em parafina, procedentes de mulheres submetidas à cirurgia para retirada dos ovários no período de 1993 a 2001, no hospital da Universidade Estadual de Campinas. Estas foram avaliadas segundo o número de células positivas, as estruturas celulares e a intensidade da reação para cada uma das moléculas analisadas. Os resultados mostraram que a maioria dos tumores malignos apresentou reações imunistoquímicas de maior intensidade ($p=0,01$) para β -catenina, além de maior número de células positivas para α -catenina ($p=0,04$). Os carcinomas endometrióides apresentaram expressão aumentada de β -catenina, tanto em número de células positivas ($p=0,04$) como também na intensidade das reações ($p=0,01$). Os tumores malignos onde a marcação para E-caderina manteve-se preservada na membrana corresponderam aos casos que não evoluíram para metástases, enquanto os tumores malignos que apresentaram expressão nula ou restrita ao citoplasma, para esta proteína, evoluíram como recidivas da doença ($p=0,04$). Considerando estes dados, a E-caderina pode ser um bom marcador de prognóstico para câncer de ovário. Paralelamente, a expressão de β - e α -cateninas aparece estatisticamente aumentada nos tumores malignos, sugerindo a possível utilização destes como marcadores discriminantes de malignidade.

Quanto à N-caderina, os dados mostraram que a expressão desta está relacionada mais precisamente ao tipo histológico dos tumores, do que com o estágio tumoral ou evolução dos casos.



ABSTRACT

Changes in the expression pattern of the adhesion molecules are observed in the malignant development of different types of cancer, being related with tumor cell invasion and metastasis. The aim of this study was to analyze and compare the expression patterns of α - and β -catenins, E- and N-cadherins in benign and malignant tumors of the ovarian surface epithelium, trying to establish possible correlations between the expression of these molecules, the tumor staging and the manifestation of metastasis in the malignant neoplasias. Immunohistochemical preparations, obtained from 88 paraffin-embedded biopsies (39 benign and 49 malignant) taken from women who underwent surgery for the resection of the ovaries from 1993 to 2001, in the hospital of the State University of Campinas. These samples were evaluated accordingly to the number of positive cells, stained cellular structures and reaction intensity for each one of the analyzed molecules. The results showed that most of the malignant tumors presented more intense β -catenin immunoreactions ($p=0,01$) and also a bigger number of α -catenin positive cells ($p=0,04$). Endometrioid carcinomas presented increased expression of β -catenin, in number of positive cells ($p=0,04$) and in the intensity of the immunoreactions ($p=0,01$). Malignant tumors where the E-cadherin staining was preserved in the membrane showed no metastasis, whereas E-cadherin negative cases or cases which presented E-cadherin expression just in the cytoplasm had metastasis in their evolution ($p= 0,04$). Considering these results, E-cadherin might be a marker of prognosis value in ovarian cancer. In addition, the increased expression of β - and α -catenin in malignant ovarian tumors suggests the use of these molecules as markers of malignancy. This data also showed that the N-cadherin expression was correlated with different histologic ovarian tumor types, but not with tumor staging or case evolution.



INTRODUÇÃO

CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário é o quinto tipo de câncer que mais acomete mulheres nos Estados Unidos e o segundo mais comum entre os tumores do trato genital feminino, perdendo apenas para o câncer de útero, porém sendo o primeiro em taxa de mortalidade. Naquele país, estima-se que, a cada ano, aproximadamente 23.100 novos casos sejam diagnosticados e que 15.000 mulheres morram vítimas pela doença (GREENLEE et al., 2000). No Brasil, o câncer de ovário aparece como o terceiro em incidência entre os tumores ginecológicos, depois dos cânceres de mama e de colo uterino, tendo sido estimada, no ano de 2001, a ocorrência de 3.280 novos casos da doença (INCA, 2001). A dificuldade para o diagnóstico precoce do câncer de ovário, faz com que este seja um dos tumores que mais matam mulheres, independentemente dos recursos propedêuticos e do estágio de desenvolvimento dos países (ROSENTHAL e JACOBS, 1998).

A etiologia do câncer de ovário ainda não está completamente esclarecida. Existem evidências de que os processos contínuos e ininterruptos de regeneração celular, decorrentes da ovulação, assim como a estimulação hormonal e a exposição a carcinógenos, estejam envolvidos nos passos que levam à transformação maligna, em razão da facilitação para ocorrência de mutações e fixação destas nas células alteradas (DALY e OBRAMS, 1998).

Estudos epidemiológicos apontam para uma relação inversa entre paridade e ocorrência do câncer de ovário. Assim, mulheres nulíparas estariam mais sujeitas a este tipo de câncer do que aquelas que já tiveram filhos. Mulheres com histórico familiar de cânceres de mama, ovário e intestino, também estariam mais propensas ao desenvolvimento desta neoplasia (HARTGE et al., 1994). Em contrapartida, o uso de contraceptivos orais parece constituir um dos fatores de proteção, segundo ROSSING et al. (1994).

Aproximadamente 90% dos tumores ovarianos têm origem no epitélio de superfície do ovário (TORTOLERO-LUNA e MITCHEL, 1995). As características particulares deste tecido, em contraposição aos demais epitélios de revestimento, associadas à alta incidência de metástases à distância, justificam a urgência de estudos sobre o comportamento biológico destas populações celulares e de suas moléculas de adesão, como participantes da carcinogênese ovariana (ONG et al., 2000).

MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

Estudos sobre desenvolvimento embrionário apontam para a importância das moléculas de adesão presentes na superfície celular. Estas formam diferentes tipos de junções celulares (junções intercelulares e célula-matriz), exercendo papel crucial em processos biológicos como: morfogênese, reconhecimento e comunicação celular, migração celular e processos de cicatrização tecidual (COLLARES-BUZATO, 2001).

Em vários tipos de neoplasias humanas, há também evidências de que alterações na expressão das moléculas de adesão desempenhem importante papel na evolução para a malignidade, sugerindo assim o estudo destas nos processos carcinogênicos (TAMURA, 1997).

Atualmente, muitas proteínas trans-membrana, responsáveis pela regulação das adesões intercelulares, vêm sendo identificadas e descritas e, entre estas, estão as Caderinas e as Cateninas.

PAPEL DAS CADERINAS E CATENINAS NOS PROCESSOS DE INVASÃO E METÁSTASE

Os processos de invasão e metástase do câncer envolvem a alteração de diferentes sistemas de adesão celular, envolvendo várias moléculas, codificadas por diferentes famílias de genes.

As caderinas são glicoproteínas responsáveis pelo mecanismo de adesão célula-célula cálcio-dependente, sendo importantes na composição da arquitetura tecidual de todo o organismo (GOODSELL, 2002). Estão divididas em vários subtipos, distintos quanto à distribuição tecidual, sendo: E-caderina, encontrada principalmente em epitélios; P-caderina, presente na placenta e no endométrio; N-caderina, em tecidos de origem nervosa; M-caderina, em músculo; etc.. Estas moléculas estão inseridas na membrana na forma de dímeros unidos por pontes de Ca^{+2} , e a adesão intercelular se dá pela interação, também por pontes de Ca^{+2} , dos domínios extracelulares de vários destes dímeros entre células vizinhas, formando estruturas chamadas de junções de adesão (ESQUEMA 1). Esta interação é homotípica, de modo que, somente células semelhantes ou que expressam o mesmo subtipo

ou um conjunto idêntico de subtipos de caderina irão aderir-se umas às outras (COLLARES-BUZATO, 2001; BREMNER et al., 2002).

A região citoplasmática das caderinas associa-se indiretamente ao citoesqueleto por meio de um complexo de proteínas denominadas cateninas. Existem três categorias de cateninas: α -catenina, β -catenina e placoglobina (ou γ -catenina). A molécula de caderina interage diretamente com a β -catenina ou com a placoglobina, as quais se associam com a α -catenina. Esta, por sua vez, liga os complexos caderina/ β -catenina e caderina/placoglobina aos microfilamentos de F-actina e α -actina do citoesqueleto celular (ESQUEMA 1). Alterações na ligação entre caderinas e cateninas resulta em comprometimento da adesão intercelular (COLLARES-BUZATO, 2001).

Nos processos de progressão tumoral, vários mecanismos moleculares podem estar envolvidos na perda de adesão entre as células neoplásicas: 1) mutações nos genes que codificam caderinas e cateninas; 2) repressão do processo de transcrição dos genes das caderinas e cateninas (através da metilação do promotor gênico) ou 3) comprometimento da interação molecular entre caderinas e cateninas (através de fosforilação dos resíduos de tirosina destas moléculas causada por oncovírus, por exemplo) (COLLARES-BUZATO, 2001; GOODSSELL, 2002).

Dentre as caderinas, a **E-caderina** é atualmente a mais estudada em processos neoplásicos, sendo apontada como uma molécula supressora de invasão e metástase tumoral (CHRISTOFORI e SEMB, 1999).

Estudos realizados com diferentes tipos de tumores humanos têm mostrado que muitos carcinomas apresentam níveis reduzidos de E-caderina, quando comparados aos níveis de expressão dos respectivos tecidos normais, com perda acentuada de expressão nos carcinomas mais invasivos, como nos lobulares de mama e nos adenocarcinomas gástricos (CHAN e WONG, 2001).

Correlações inversas entre a expressão de E-caderina e a invasão celular foram observadas ainda em linhagens celulares de carcinomas de esôfago, intestino, endométrio, mama, pulmão, bexiga e pâncreas, enquanto que regulação comprometida de sua expressão ocorre numa grande variedade de carcinomas sólidos, incluindo os de cólon e reto, de pele, meninges, esôfago, tireóide, glândulas mamárias, estômago, fígado, rim, pâncreas, bexiga,

cérvice e próstata (DAVIES et al., 1998). Alterações na expressão da E-caderina e/ ou falha na unidade funcional E-caderina/cateninas foram também detectadas em lesões pré-invasivas do cólon do intestino (adenomas), cérvice (neoplasia intraepitelial cervical) e esôfago (displasia de Barrett's) (SMITH e PIGNATELLI, 1997).

Mutações somáticas no gene da E-caderina já foram descritas, em diferentes tipos de neoplasias. As mais comumente citadas são a metilação do promotor gênico e a perda de heterozigose* (*LOH*, do inglês *loss of heterozygosity*) que resultam em formas alteradas, truncadas ou em expressão nula da proteína (SMITH e PIGNATELLI, 1997; CHAN e WONG, 2001).

Mutações germinativas do gene codificador *CDH1* (localizado em 16q23), embora pouco comuns, foram descritas em alguns membros de famílias afetadas por uma síndrome rara de câncer hereditário de mama e estômago (*Hereditary Diffuse Gastric Cancer*) (CHAN e WONG, 2001).

A **N-caderina**, primeiramente isolada em tecidos de origem nervosa, é normalmente expressada pelas células do epitélio de superfície do ovário não neoplásico, cuja expressão de E-caderina encontra-se reduzida ou mesmo ausente (WONG et al., 1999).

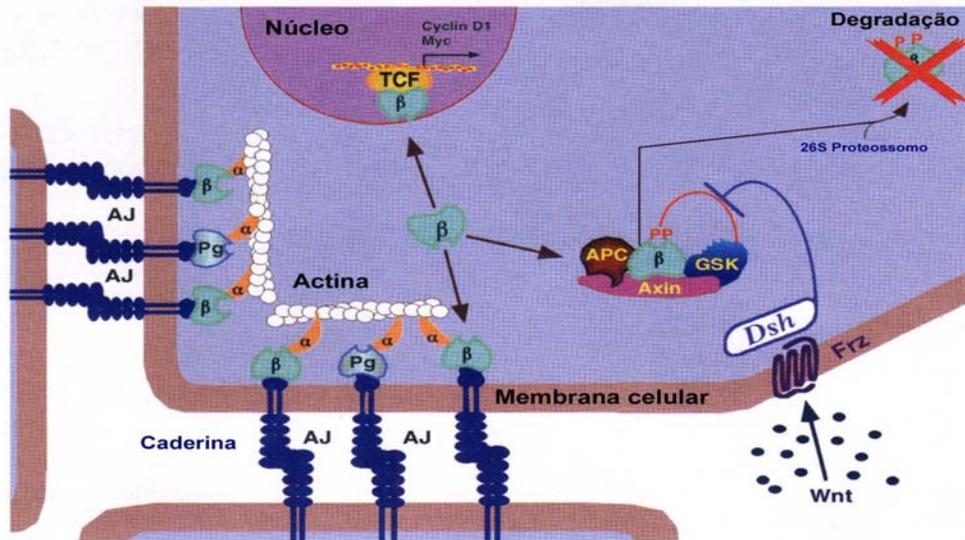
Estudos de ISLAM et al. (1996) mostraram que a N-caderina é capaz de induzir o desenvolvimento de um fenótipo mesenquimal mais achatado e a redução dos níveis de E- e P-caderinas, em linhagens celulares de carcinomas provenientes de células escamosas bucais. Este achado sugere que a N-caderina deve contribuir diretamente para a formação do fenótipo celular invasivo. Confirmando esta hipótese, estudos têm mostrado que, enquanto a E-caderina é capaz de promover apenas a ligação célula-célula, a N-caderina pode promover tanto interações celulares estáveis quanto lábeis, as quais facilitarão a ocorrência de processos dinâmicos como crescimento, migração e invasão celular (RIEHL et al., 1996; BIXBY e ZHANG, 1999; HAZAN et al., 1997). Em contra partida, estudos *in vitro* realizados com mieloblastos normais sugerem que a N-caderina promove inibição de contato e de migração celular (HUTTENLOCHER et al., 1998).

* Perda do alelo normal (por mutação, deleção, recombinação somática ou perda e reduplicação), em células provenientes de indivíduos heterozigotos para um determinado gene (gene supressor de tumor), levando à perda ou deficiência na função gênica e aquisição do fenótipo tumoral (Modificado de JORDE et al., 1995).

Estudos mais recentes sugerem que a N-caderina acelera a sinalização via tirosina quinases e a mobilidade celular, sendo que altos níveis desta proteína têm sido observados em linhagens celulares de tumores invasivos. A habilidade da N-caderina em acelerar os processos celulares de mobilidade, invasão e metástase deve-se, aparentemente, à ativação dos receptores de sinais do fator de crescimento fetal FGF-2 (do inglês, *fetal growth factor-2*), envolvendo interações entre estes e o domínio extracelular das moléculas de N-caderina (NIEMAN et al., 1999; HAZAN et al., 2000). Em estudos de linhagens celulares de mama, há relatos de que a produção de metaloproteinase-9 (MMP-9) estaria aumentada através da expressão da N-caderina, em resposta a fatores de crescimento, conferindo a estas células uma maior capacidade de invadir a matriz extracelular (HAZAN et al., 2000).

A **β -catenina** (proteína codificada pelo gene *CTNBI*, mapeado no cromossomo 3p21) exerce papel na sinalização intracelular, localizando-se como “poços” de proteínas monoméricas livres no citoplasma. Esta proteína pode também penetrar no núcleo, onde atua como fator de transcrição gênica para genes que estimulam a proliferação celular, como o *c-myc* e o *cyclin D1* (PEIFER, 1997; PEIFER e POLAKIS, 2000).

Os níveis citoplasmáticos de β -catenina são controlados pela Via de Transmissão de Sinais Wnt (ESQUEMA 1). Quando não há sinalização Wnt (como ocorre na maioria das células normais adultas), a β -catenina é seqüestrada em um complexo formado pelo produto do gene *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*), a enzima GSK-3 (do inglês *glycogen synthase kinase 3*), e a proteína Axin, sendo rapidamente destruídas nos proteossomos através de fosforilação mediada pela GSK-3. Quando as células são expostas às proteínas de sinalização Wnt (como ocorre durante desenvolvimento embrionário), esta via é novamente iniciada, ativando a proteína Disheveled (*Dsh*) que, por sua vez, regula para baixo a atividade do complexo GSK-3/ Axin/ APC, bloqueando a fosforilação da β -catenina. Deste modo, a β -catenina escapa à destruição, acumulando-se no citoplasma e entrando também no núcleo celular, onde se liga à família dos genes *TCF/LEF* (do inglês *T Cell Factor-lymphoid Enhancer Factor Family*), desencadeando assim a transcrição gênica (PEIFER e POLAKIS, 2000; BREMNER et al., 2002).



Modificado de CONACCI-SORRELL et al., 2002.

ESQUEMA 1- O duplo papel da β -catenina, na adesão celular e na ativação da transcrição gênica: A β -catenina (B) e a Placoglobina (Pg) ligam-se à caderina e, via α -catenina, ligam-se ao citoesqueleto celular, formando a junção de adesão (AJ). Quando a via de sinalização Wnt esta inativa, as moléculas livres de β -catenina são recrutadas pelo complexo GSK3/APC/Axin e, após fosforilação, é degradada nos proteossomos 26S.

Mutações na proteína APC (*Adenomatous Polyposis Coli* gene, mapeado no cromossomo 5q21), componente do complexo de destruição da β -catenina, assim como mutações na própria β -catenina, mimetizam o efeito da Via Wnt ativada, ou seja, impossibilitam a ligação da β -catenina ao complexo GSK-3/ Axin/ APC/ proteossomos e sua degradação pela enzima GSK-3. Conseqüentemente, ocorre o acúmulo desta no interior da célula (PEIFER,1997). Mutações na β -catenina foram descritas em alguns casos de câncer de cólon e reto, para os quais não foram encontradas mutações na proteína APC (ILYAS e TOMLINSON, 1997). A β -catenina também pode interagir com receptores de tirosina quinases, como os receptores do fator de crescimento epitelial (EGF, do inglês *epithelial growth factor*) e sofrer alterações de fosforilação, resultando na possível

modulação responsável pela formação dos complexos de adesão intercelular, mediados pelo complexo E-caderina-cateninas (BREMNER et al., 2002).

Estudos sugerem que apenas o aumento dos níveis de β -catenina pode ser suficiente para promover formação de tumores, apontando para o importante papel das mutações desta proteína na transformação tumoral em diversos tipos celulares (MILLER et al., 1999).

A **α -catenina** (proteína codificada pelo gene *CTNNA1*, mapeado no cromossomo 5q) aparece fortemente expressa na membrana de células epiteliais não neoplásicas. Porém, 76% dos tumores de mama, cólon, estômago e esôfago apresentam expressão reduzida desta molécula que, nestes casos, é encontrada difusa no citoplasma e ausente na membrana celular (SHIOZAKI et al, 1996), o que sugere a possibilidade de anormalidades estruturais e funcionais na molécula de α -catenina, durante a carcinogênese.

Deleções homozigóticas no gene da α -catenina, levando à perda da capacidade de adesão celular, têm sido observadas em linhagens celulares de carcinomas pulmonares. Nestas, a capacidade de adesão celular pôde ser restaurada, através da introdução de moléculas α -catenina do tipo selvagem no sistema (HIRANO et al., 1992). O mesmo fenômeno foi também observado em uma linhagem de carcinoma ovariano, que também apresentava deleções no gene da α -catenina (BULLIONS et al., 1997). Além disso, deleções no sítio de ligação da β -catenina, no gene *CTNNA1*, têm sido identificadas em carcinomas gástricos de células em anel de sinete. Nestas células, o complexo E-caderina/ β -catenina é formado, mas a falta de α -catenina não permite a ligação às moléculas de actina do citoesqueleto, com conseqüente perda de adesão celular (CONACCI-SORRELL et al., 2002).

Em estudo com camundongos, onde o gene da α -catenina foi eliminado nos tecidos da epiderme, as junções de adesão caderina/cateninas foram rompidas e as células epiteliais passaram a proliferar além do normal (VASIOUKHIN et al., 2001). Esta hiperproliferação celular tem sido atribuída à sinalização aberrante mediada pelas moléculas participantes dos sistemas de adesão, sugerindo assim que rupturas no complexo caderina/

cateninas estariam diretamente contribuindo para a oncogênese (CONACCI-SORRELL et al., 2002).

EXPRESSÃO DAS CADERINAS E CATENINAS EM TUMORES DE MAMA E OVÁRIO

A expressão reduzida ou ausente das caderinas e cateninas aparece associada ao desenvolvimento de metástases, nos carcinomas de mama. Há também relatos sobre a ocorrência de intensa reação imunoistoquímica para a E-caderina, α - e β - cateninas em tumores metastáticos de mama, em portadoras de tumores primários nos quais a expressão destas proteínas estava ausente. Este fato sugere a re-expressão dessas moléculas de adesão pelas células tumorais mamárias, após desprendimento dos tumores primários (BULKHOLM et al. 1998; ILYAS, 2000).

A re-expressão de moléculas de adesão, observada nas metástases de câncer de mama, pode ser importante, e talvez necessária, para que as células tumorais possam se fixar a outros órgãos do organismo; porém os mecanismos envolvidos neste processo permanecem obscuros (BULKHOLM et al., 2000).

A perda da função do complexo E-caderina/cateninas parece ser um ponto essencial para o desenvolvimento dos carcinomas de mama, quer lobulares, quer ductais, sendo observada amplificação do c-Erb-B2 (ILYAS, 2000), mutações no gene da E-caderina ou perdas alélicas no cromossomo 16q (BERX et al., 1998).

Estudos mais recentes relatam a ocorrência de mutações no domínio extracelular do gene da E-caderina, gerando uma proteína truncada, incapaz de participar dos complexos com as cateninas, estando presente em 60% dos casos de carcinomas lobulares invasivos de mama. Os carcinomas lobulares *in-situ* também apresentavam mutações na E-caderina, sugerindo a inativação desta como um evento inicial na gênese dos carcinomas lobulares mamários (CHAN e WONG, 2001).

A expressão da N-caderina em carcinomas de mama parece correlacionar-se com os processos de mobilidade e invasão. Os experimentos de NIEMAN et al. (1999) mostraram que a expressão induzida de E-caderina, em células N-caderina positivas, não

reduziu a mobilidade nem a sua capacidade invasiva. Entretanto, a expressão induzida de N-caderina, em células E-caderina positivas, tornou-as mais invasivas, mesmo estas continuando a expressar altos níveis de E-caderina. Isso sugere que a N-caderina possa promover diretamente a mobilidade celular nos carcinomas de mama.

Contrastando com o padrão observado nos tumores de mama e na maioria dos tecidos tumorais, a expressão da E-caderina no epitélio de superfície do ovário normal é rara; porém torna-se abundante em tumores epiteliais ovarianos, especialmente nos carcinomas bem-diferenciados, contrastando com a perda de expressão observada nos carcinomas ovarianos pouco diferenciados (WONG et al., 1999). Estudos sugerem ainda que as cateninas α e β estariam constantemente expressas no epitélio ovariano normal e nos tumores ovarianos benignos, contrastando com os níveis especialmente reduzidos ou ausentes nos carcinomas pouco diferenciados (DAVIES et al., 1998).

DARAI e SCOAZEC (1999) relataram a ocorrência de um decréscimo na expressão de E-caderina nos primeiros passos da carcinogênese ovariana humana, durante a transição da condição de tumor benigno para a de tumor *borderline* (SCULLY et al., 1999) (ANEXO II), sendo que na evolução para tumor maligno ocorrem alterações na expressão de N-caderina. Em contrapartida, os resultados de ONG et al. (2000) mostraram que a expressão de N-caderina não é afetada pela progressão neoplásica das células do epitélio ovariano de superfície, estando a expressão de E-caderina aumentada no início do processo da carcinogênese ovariana e reduzida nos carcinomas de estágios avançados e de alto grau histológico.

Os mecanismos que regem essas mudanças *in vivo* podem incluir mecanismos autócrinos e parácrinos, assim como mecanismos genéticos e epigenéticos, envolvendo a E-caderina e as moléculas a ela associadas, sendo porém rara a ocorrência de mutações no gene da E-caderina, nas neoplasias epiteliais ovarianas.

Atualmente, sabe-se que, no epitélio ovariano, a expressão de caderinas está diminuída nos tumores *borderline* e malignos, dados que podem auxiliar na distinção entre estes e os benignos (DARAI e SCOAZEC, 1999).

As caderinas e as moléculas de APC (produto do gene *Adenomatous Polyposis Coli*) competem pela interação com a β -catenina, sugerindo que os complexos formados por estas proteínas e as cateninas podem regular o balanço entre migração, adesão e

proliferação celulares, nos tecidos epiteliais. Estudos mostram que a proteína APC localiza-se em sítios da membrana plasmática das células do epitélio de superfície do ovário (OSE, do inglês, *ovarian surface epithelium*) envolvidos na migração celular ativa, como resposta à cicatrização de feridas. Este fato sugere que os complexos APC-cateninas podem ser importantes na migração das células epiteliais ovarianas para reparar a lesão causada pela liberação do folículo durante a ovulação (DAVIES et al., 1998).

Há estudos indicando que a expressão de α - e β - cateninas estaria mantida nos cistoadenomas e reduzida ou completamente ausente em alguns adenocarcinomas ovarianos (DAVIES et al., 1998). Nos casos de câncer de ovário, a perda de heterozigose no cromossomo 5q, onde está localizado o gene da α - catenina, é bastante comum (SHELLING et al.,1995). Entretanto, mutações neste gene parecem ser eventos raros nas neoplasias epiteliais ovarianas, indicando talvez que o desenvolvimento tumoral para a malignidade não esteja relacionado com a ocorrência de mutações no gene da α - catenina (DAVIES et al., 1998).

PALACIOS e GAMALLO (1998) relataram mutações no gene da β -catenina em tumores ovarianos endometrióides, acompanhando a localização nuclear desta molécula. Os resultados de WRIGHT et al. (1999) também sugerem que mutações ativas da β -catenina seriam importantes na progressão de um pequeno número de tumores endometrióides do OSE. Entretanto, nos demais tipos histológicos analisados, observaram ausência de mutações neste gene e expressão nula de β -catenina no núcleo celular. Estas observações estão de acordo com a hipótese de que diferentes subtipos histológicos de câncer de ovário representam eventos tumorais distintos e independentes (WRIGHT et al.,1999).

Os estudos de WRIGHT et al. (1999) mostram ainda que a maioria das mutações no gene *CTNNB1* removem sítios de fosforilação, estabilizando a β -catenina e ativando, o complexo transcricional β -catenina-Tcf-Lef, no núcleo celular. Deste modo, as mutações no gene *CTNNB1*, observadas em carcinomas ovarianos endometrióides de estágio e grau histológicos pouco avançados, poderiam ser consideradas eventos iniciais importantes no desenvolvimento tumoral. Por sua vez, DAVIES et al. (1998) relataram não

ter encontrado correlação entre estágio tumoral, tipo histológico do tumor e expressão da β -catenina.

ABORDAGEM METODOLÓGICA PARA DETECÇÃO DAS CADERINAS E CATENINAS – IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica de Imunoistoquímica baseia-se na habilidade de um anticorpo reconhecer seu antígeno específico e na detecção desta interação, através de diferentes métodos de marcação.

Os ensaios de imunoistoquímica foram introduzidos por COONS et al. (1941). Estes demonstraram a existência de antígenos virais de *pneumococci* em tecidos, utilizando anticorpos marcados com uma substância fluorescente. A partir daí, surgiram o método de marcação indireta, as técnicas de marcação enzimática através de imunoperoxidase (AVRAMEAS e URIEL, 1966) e da peroxidase/ anti-peroxidase (PAP) (STERNBERGER, 1979), além do complexo avidina-biotina (*ABC Complex*) (FALINI e TAYLOR, 1983). Tais recursos permitiram a marcação em tecidos fixados e incluídos em parafina e a observação desta marcação ao microscópio de luz convencional. Na década de 80, as técnicas de imunoistoquímica ganharam credibilidade, passando a ser utilizadas pelos patologistas como ferramenta auxiliar no diagnóstico anátomo-patológico (FALINI e TAYLOR, 1983).

Os testes de imunoistoquímica são fáceis e rápidos de ser executados, apresentando baixo custo financeiro, quando comparados aos de biologia molecular. Além disso, permitem a visualização da expressão antigênica sem que seja necessária a destruição da morfologia dos tecidos, o que é de extrema importância nos estudos anátomo-patológicos.

A melhoria na qualidade dos anticorpos e dos sistemas de amplificação de sinais oferecidos comercialmente, o uso de controles de reação, assim como a busca de padronização dos protocolos e das formas de interpretação dos resultados, têm possibilitado uma análise menos subjetiva e de caráter não só qualitativo, mas também direcionado a avaliações quantitativas dos ensaios imunoistoquímicos (VAN DIEST et al., 1997; SEIDAL et al., 2001).

A detecção da expressão das caderinas e cateninas no diagnóstico anátomo-patológico, realizada através de ensaios imunoistoquímicos, vem sendo utilizada na distinção entre carcinomas lobulares e ductais de mama, sendo os primeiros quase sempre negativos para E-caderina, enquanto os outros freqüentemente apresentam-se positivos. A marcação com anticorpos anti-E- e anti-N-caderina podem ainda ser utilizados na distinção entre carcinomas e mesoteliomas, em biópsias de pleura/peritônio, uma vez que as células de carcinoma expressam E-caderina, enquanto que as de mesoteliomas expressam N-caderina (CHAN e WONG, 2001).

A partir da observação de testes de imunoistoquímica, a expressão reduzida de E-caderina, em células tumorais, tem sido associada ao aumento na freqüência de metástases e ao pior prognóstico, nos casos dos carcinomas de estômago, mama e próstata, apontando para o uso da E-caderina como marcador de prognóstico e seguimento destas neoplasias (GIROLD e SCHALKEN, 1993; ELZAGHEID et al., 2002).



OBJETIVOS

O presente estudo propôs-se a investigar os seguintes aspectos, em cortes histológicos de tumores de ovário, através de ensaios de imunistoquímica:

GERAL

Investigar a participação das moléculas de adesão, representadas pelas cadenas E e N e pelas cateninas α e β , no processo de invasão tecidual e na produção de metástases.

ESPECÍFICOS

- Investigar e comparar os níveis de expressão das caderinas E e N, cateninas α e β nas neoplasias epiteliais benignas e malignas do ovário.
- No caso das neoplasias malignas do ovário, investigar e comparar a expressão destas moléculas nos estádios iniciais (I, II) e avançados da doença (III e IV).
- Verificar a possível associação entre alterações na expressão dessas moléculas e a manifestação de metástases ao diagnóstico.
- Verificar a possível associação entre alterações na expressão dessas moléculas e a evolução dos casos, priorizando as recidivas e períodos livres de doença.
- Verificar a possível utilização destas moléculas como marcadores de prognóstico e/ou seguimento, nas neoplasias epiteliais do ovário.



***MATERIAL E
MÉTODOS***

AMOSTRA

Os materiais estudados foram provenientes de mulheres portadoras de neoplasias ovarianas do tipo epitelial, malignas ou benignas, e que foram submetidas à extração cirúrgica do tumor no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM/UNICAMP).

Foram analisadas todas as biópsias de neoplasias epiteliais ovarianas arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica (FCM/UNICAMP), no período de 1993 a 2001, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos para o presente estudo, de modo a compor uma amostra representativa de 88 casos, sendo 39 de neoplasias benignas e 49 de neoplasias malignas (ANEXO I).

A classificação histopatológica dos tumores e o estágio clínico das pacientes foram estabelecidos segundo os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (SCULLY et al., 1999) e pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (PECORELLI et al., 1999), respectivamente (ANEXO II).

As biópsias foram processadas para análise imunoistoquímica e investigadas segundo a expressão de alfa e beta-cateninas, assim como N e E-caderinas, todas elas intimamente envolvidas nos processos de adesão celular, conforme os dados apresentados na TABELA 1.

TABELA 1- Composição da amostra segundo o número de casos de neoplasias, os estádios clínicos e os ensaios realizados com os respectivos anticorpos para as cateninas e caderinas investigadas.

NEOPLASIAS	β -catenina	α -catenina	E-caderina	N-caderina
BENIGNAS	39	37	33	35
MALIGNAS				
Estádios I-II	20	20	20	20
Estádios III-IV	29	29	28	28
TOTAL	88	86	81	83

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas na amostra avaliada neste estudo:

- Biópsias de carcinomas provenientes de mulheres portadoras de tumor primário de ovário, em estádios clínicos I a IV, comprovados através de exame anátomo-patológico;
- Biópsias provenientes de neoplasias ovarianas benignas, comprovadas através de exame anátomo-patológico.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Biópsias com diagnóstico histopatológico não compatível com neoplasia do tipo epitelial ovariano;
- Biópsias que apresentaram fixação ou condições de preservação inadequadas para os ensaios propostos;
- Biópsias provenientes de tumores *borderline* de ovário;
- Casos nos quais os achados anatomo-patológicos mostraram neoplasia primária de ovário associada à ocorrência sincrônica de outra neoplasia, também primária.

MÉTODOS

Coleta e Processamento do Material

Os espécimes estudados compreenderam blocos de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, sendo que as respectivas lâminas com coloração de hematoxilina/eosina (HE) foram detalhadamente revistas por um patologista da instituição, visando a confirmação do diagnóstico e a seleção das áreas mais representativas de epitélio ovariano.

Um único bloco foi selecionado por paciente. A partir de cada bloco, 6 cortes histológicos seqüenciais de 5 µm de espessura cada foram preparados e fixados em lâminas tratadas com silano. Dos cortes obtidos para cada caso, os 4 melhores foram utilizados nos ensaios de imunistoquímica, sendo um corte para cada uma das moléculas analisadas.

REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

As lâminas foram incubadas, para remoção da parafina, por uma hora em estufa a 110°C, em 3 banhos de xilol de 1 minuto cada e reidratadas em uma série de álcoois (100%, 85% e 70%).

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de três minutos cada, em peróxido de hidrogênio 10%, seguida pela recuperação antigênica através da imersão sucessiva em água destilada e tampão citrato (ácido cítrico 10mM), sob vapor, a 95 °C, durante 30 minutos.

O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado mediante incubação das lâminas com Soro Fetal Bovino, à temperatura ambiente, por 30 minutos.

A aplicação do anticorpo primário foi realizada à temperatura ambiente, após nova lavagem das preparações em água destilada (procedência, clones e diluições dos anticorpos primários utilizados para cada uma das moléculas - TABELA 2). Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C, durante 30 minutos e a seguir a 4 °C, durante cerca de 16 horas. O anticorpo secundário (EnVision – DAKO) foi aplicado após lavagem em tampão PBS (*phosphate buffer saline*), pH 7.6, sob agitação.

Para revelação da reação, as preparações foram incubadas, por 1 hora, em câmara úmida a 37 °C e imersas em PBS. A Diaminobenzidina (DAB - SIGMA) foi dissolvida em peróxido de hidrogênio e PBS, sendo as lâminas incubadas nesta solução por 5 minutos em estufa a 37 °C e lavadas em água destilada. Aplicada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris durante 10 segundos, passagem pela série de álcoois (70%, 85% e 100%) e por banhos de xilol, a montagem permanente foi feita em *Entellan Mounting Media* (MERCK).

TABELA 2- Procedência, clones e diluições dos anticorpos primários utilizados.

Molécula	Anticorpo Primário	Fabricante	Clone	Diluição
E-caderina	<i>Monoclonal mouse</i> <i>anti-E-cadherin</i>	ZYMED Laboratories	HECD-1	1:200
N-caderina	<i>Monoclonal mouse</i> <i>anti-N-cadherin</i>	ZYMED Laboratories	3B9	1:200
α-catenina	<i>Monoclonal mouse</i> <i>anti-α-catenin</i>	ZYMED Laboratories	α CAT-7A4	1:50
β-catenina	<i>Monoclonal mouse</i> <i>anti-β-catenin</i>	ZYMED Laboratories	CAT-5H10	1:250

Lâminas controle foram feitas em todos os ensaios imunistoquímicos realizados, contendo estas cortes histológicos de tecidos humanos não tumorais, sabidamente positivos para a expressão dos antígenos em estudo. Os tecidos usados como controles positivos foram: mama e fígado, positivos para E-caderina e N-caderina, respectivamente. Para as cateninas α e β , o controle positivo corresponderam a epitélios de superfície do ovário normal (FIGURAS 1-4).

Todos os ensaios foram acompanhados ainda de controles negativos de reação constituídos por lâminas contendo tecido sabidamente positivo para os antígenos em análise, os quais não foram incubados com o respectivo anticorpo primário.

LEITURA DAS PREPARAÇÕES

A leitura das lâminas foi efetuada em microscópio de luz convencional, por três observadores distintos, estando entre estes um patologista.

As três leituras assim obtidas foram comparadas e discutidas sendo, após consenso entre os observadores, montada uma tabela única com resultados sobre a análise das preparações para cada uma das moléculas estudadas (ANEXO III). Leituras muito discrepantes foram revistas e discutidas pelos três pesquisadores para se alcançar um consenso.

Os parâmetros avaliados durante a leitura das lâminas foram os seguintes:

- 1-) percentual de células com marcação positiva para os antígenos, sendo os casos analisados divididos em 3 categorias: de totalmente negativo até 10% das células positivas; de 11% a 50% das células positivas e mais de 50% das células positivas;
- 2-) intensidade da reação e divisão dos casos nas categorias negativa, fraca, moderada ou forte;
- 3-) padrão de estruturas coradas, sendo: C – marcação positiva observada apenas no citoplasma, C/M – marcação positiva observada em citoplasma e membrana, e C/M/N – marcação positiva observada no núcleo e também em citoplasma e/ou membrana celular).

A contagem das células positivas foi feita nas áreas com coloração inequívoca para eventuais artefatos técnicos e interação com os respectivos anticorpos primários (chamadas de *hot spots* de reação) através de uma ocular com grade de contagem (ZEISS), segundo sistema de quantificação para imunistoquímica proposto por VAN DIEST et al. (1997). Desta maneira, foram amostradas e contadas 500 células em cada lâmina, sendo posteriormente calculado o percentual daquelas positivas para o antígeno.

ACOMPANHAMENTO DOS SUJEITOS

Os dados sobre a evolução dos casos foram extraídos a partir da consulta aos respectivos prontuários, estabelecendo-se um período mínimo de 2 anos de acompanhamento, no caso das neoplasias malignas, contrastando com período variável no caso das benignas.

ASPECTOS ÉTICOS

Os princípios da declaração de Helsinki foram respeitados, mantendo-se os nomes das pacientes em sigilo, sendo estes substituídos por codificação numérica.

A aplicação de um termo de consentimento foi dispensada por se tratar de estudo retrospectivo, sem alteração nos procedimentos para tratamento das pacientes e/ou coletas adicionais de material.

O presente estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FCM/UNICAMP e pelo CONEP/ Brasília, DF, cujos pareceres constam do ANEXO IV.

TESTE ESTATÍSTICO

As relações entre as variáveis e parâmetros propostos neste estudo foram investigadas através do Teste Exato de Fisher (FISHER e VAN BELLE, 1993).

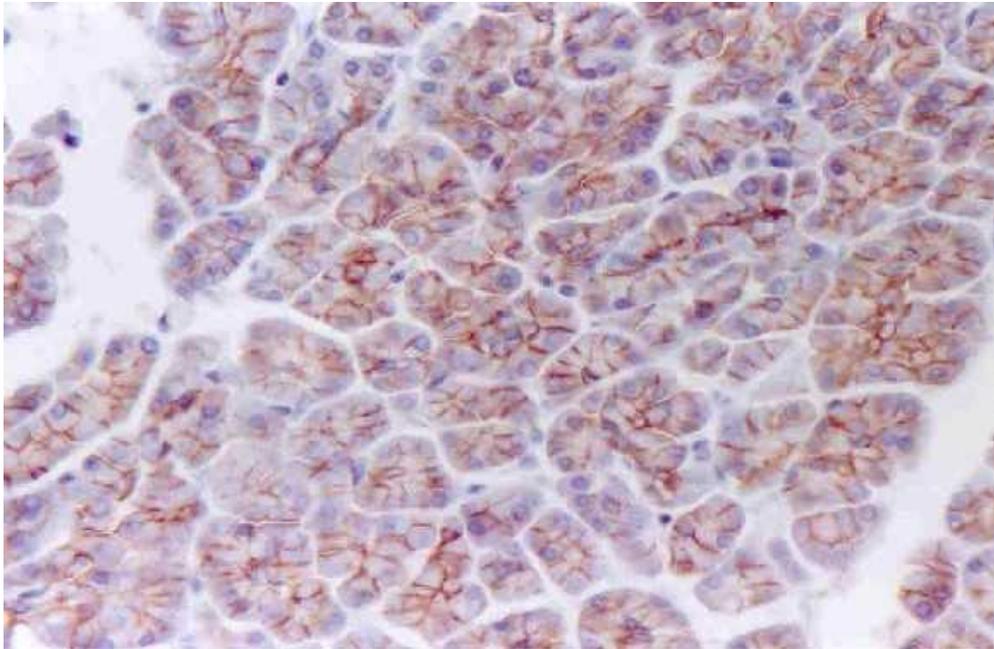


Figura 1- Pâncreas normal expressando E-caderina na membrana celular (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

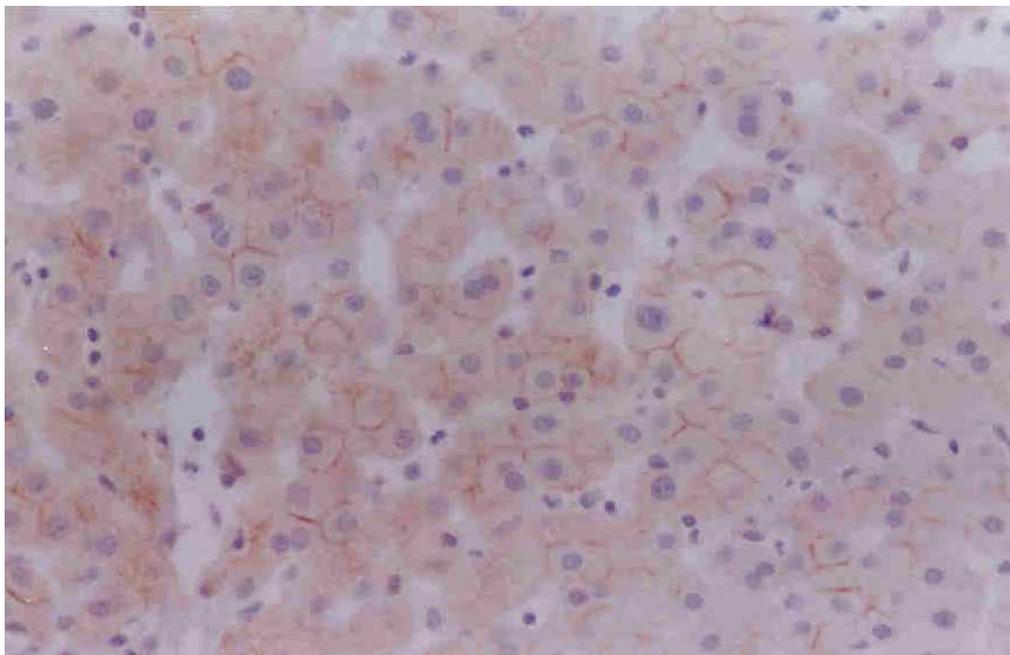


Figura 2- Fígado normal expressando N-caderina na membrana celular (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

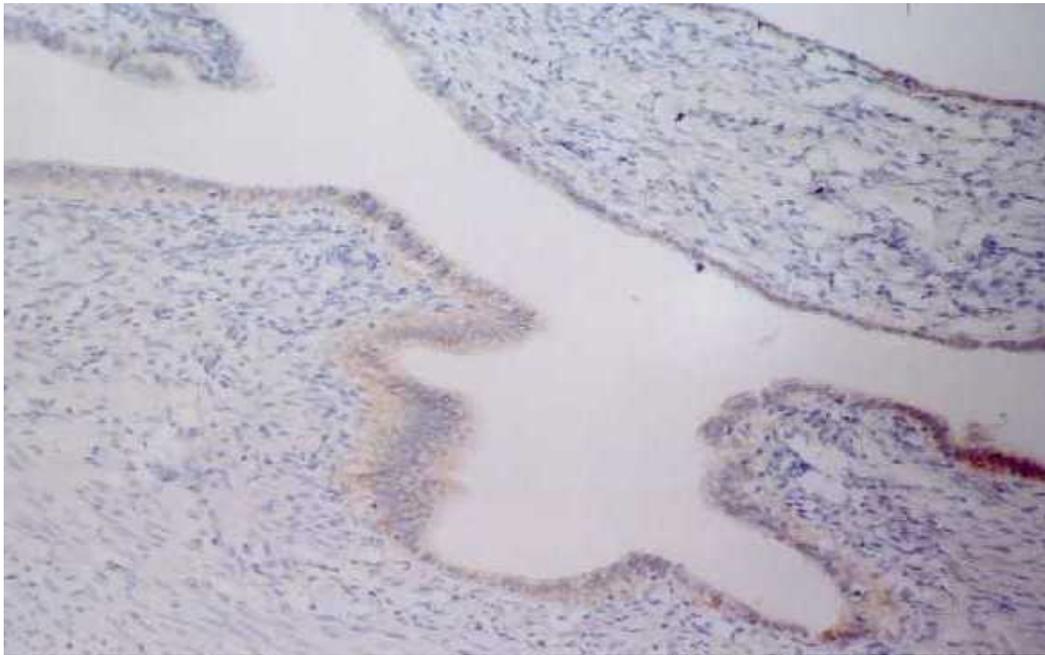


Figura 3- Expressão citoplasmática da α -catenina em cisto benigno na superfície do ovário (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X

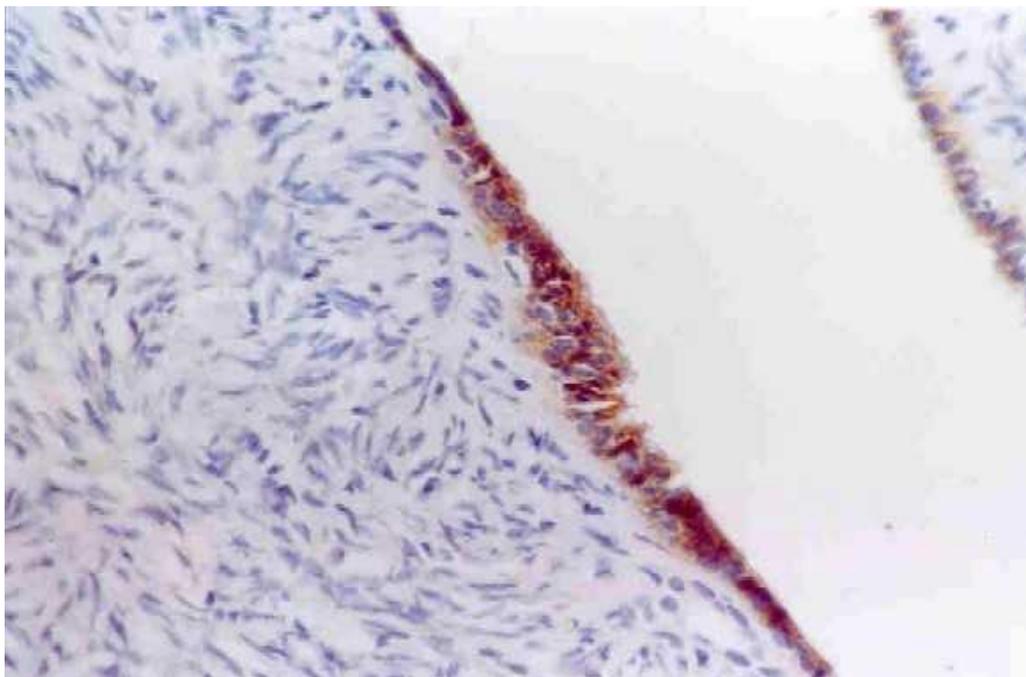


Figura 4- Epitélio de superfície (mesotélio) do ovário normal expressando β -catenina intracitoplasmática (Controle Positivo). Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.



RESULTADOS

A partir dos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, obteve-se uma amostra de 88 espécimes, sendo 49 de neoplasias malignas e 39 de benignas, distribuídas segundo os dados relatados na TABELA 3 e classificadas segundo os critérios apresentados no ANEXO II. Foram incluídos na categoria outros, neste estudo, os adenocarcinomas, os carcinomas mistos e os de células claras.

TABELA 3- Distribuição da amostra segundo a classificação histopatológica dos tumores e estadiamento clínico (para definição dos critérios de classificação, vide ANEXO II).

Neoplasias	Nº de Casos	Estádio Clínico	Classificação Histopatológica			
			Serosos	Mucosos	Endometrióides	Outros
Benignas	39		26	13	0	0
Malignas	16	I	3	6	4	3
	4	II	1	0	1	2
	27	III	12	1	6	8
	2	IV	1	0	0	1
Total	88		43	20	11	14

O detalhamento acerca das características clínicas e histopatológicas das pacientes que compuseram a amostra estão relacionados em tabela geral no ANEXO I. De forma semelhante, a avaliação final dos ensaios de imunoistoquímica realizados para cada um dos casos investigados estão relacionados em tabela geral do ANEXO II.

EXPRESSÃO DE E-CADERINA

O padrão de expressão da E-caderina considerado normal, neste estudo, correspondeu à reação de moderada intensidade na membrana, isolada ou manifestada também no citoplasma e com distribuição uniforme ao longo do epitélio de superfície preservado (FIGURA 1). Reações de coloração com topografia diversa foram consideradas como "deslocadas" do padrão original e classificadas como: deslocadas para núcleo ou deslocadas para citoplasma (FIGURA 5).

A análise estatística não detectou diferenças significativas entre os padrões de expressão dos diversos tipos histológicos de tumores, entre os diversos estádios clínicos ou a ocorrência de metástases (TABELA 4).

Apesar dos valores aquém da significância estatística, apenas 7 tumores benignos (21,1%) mostraram-se negativos, contrapondo-se a 39,6% de negatividade nos malignos. Entre os tumores malignos, 45% dos casos estádios I ou II apresentaram marcação de membrana, para apenas 25% dos estádios III e IV, porém não sendo esta uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto, com relação à topografia da marcação, a E-caderina revelou-se, entre as demais moléculas, a única com expressão distinta com relação à evolução da doença, conforme os dados da TABELA 4. Assim, entre as neoplasias malignas, 52,6% dos casos com marcação de membrana inalterada revelaram evolução livre de doença, enquanto que as neoplasias que evoluíram com recidivas mostraram-se mais freqüentemente negativas (37% dos casos) ou com marcação citoplasmática isolada (44,5% dos casos) (FIGURAS 5 e 6).

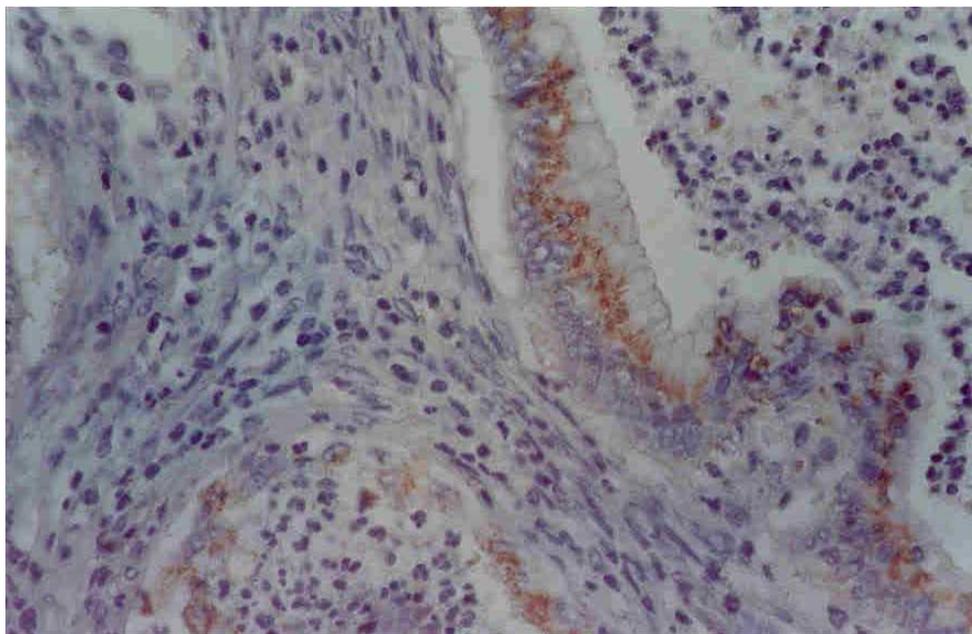


Figura 5- Adenocarcinoma mucoso, estágio Ia, expressando E-caderina em citoplasma. Notar padrão de marcação basal, encontrado também em vários outros espécimes analisados. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

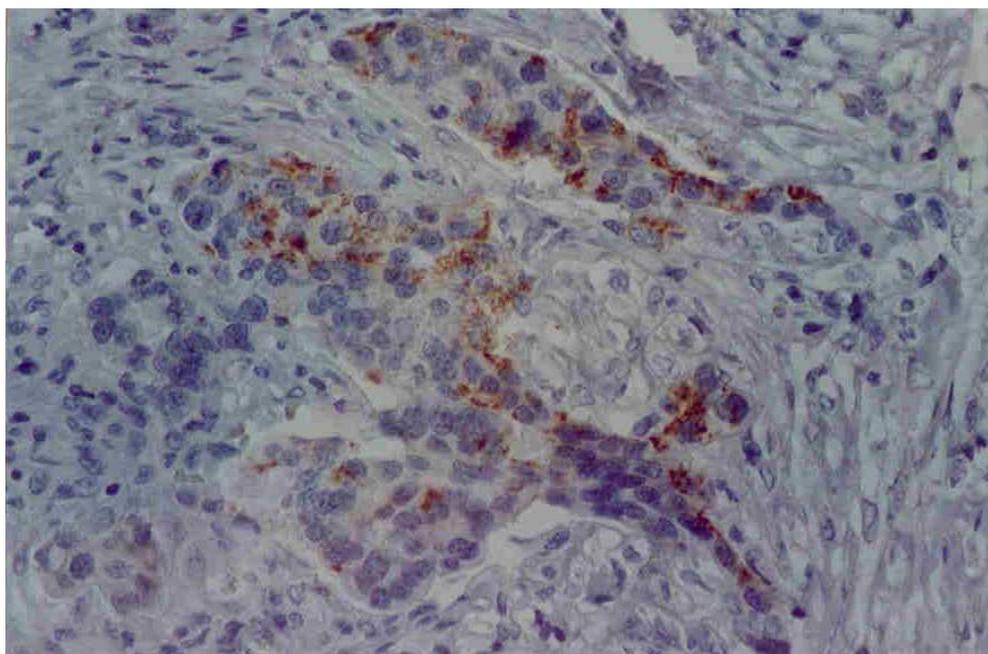


Figura 6- Adenocarcinoma endometrióide, estágio IIIc, intensivamente positivo para E-caderina. Notar o aspecto granular da marcação citoplasmática, também observado para vários outros espécimes analisados. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

EXPRESSÃO DE N-CADERINA

O padrão geral de expressão da N-caderina correspondeu à reação, via de regra, positiva, ao longo do epitélio de superfície preservado (FIGURA 7).

Nas neoplasias ovarianas malignas, 75% foram negativas para a expressão de N-caderina, enquanto que 57% dos tumores benignos foram negativos para o mesmo marcador, porém não sendo esta uma diferença de significância estatística. Preparações imunoistoquímicas com marcação intensa só foram observadas no grupo dos tumores benignos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (TABELA 5) (FIGURAS 7 e 8).

A marcação nuclear para N-caderina foi observada em apenas 2 casos malignos (2 adenocarcinomas mistos, um com componentes mucoso e seroso, e outro com componentes endometrióide e mucoso) e em 4 tumores benignos (3 adenomas serosos e 1 adenofibroma seroso) (TABELA 5).

Com relação às neoplasias malignas, também não foram encontradas diferenças significativas entre a expressão de N-caderina, o estágio clínico tumoral e a evolução dos casos.

Quanto aos diferentes tipos histológicos, valores estatisticamente significativos foram observados para todas as variáveis analisadas (TABELA 5). Nestes casos, a grande maioria dos tumores mucosos, malignos ou benignos, (97%), dos carcinomas endometrióides (82%) e dos carcinomas mistos ou de células claras (85%), apresentaram-se negativos para N-caderina (TABELA 5, ANEXO III). Por outro lado, os tumores serosos mostraram, preferencialmente, marcação de membrana, associada ou não à de citoplasma. Neste grupo foram encontradas, isoladamente, colorações intensas e deslocadas para o núcleo, conforme relatado na TABELA 5.

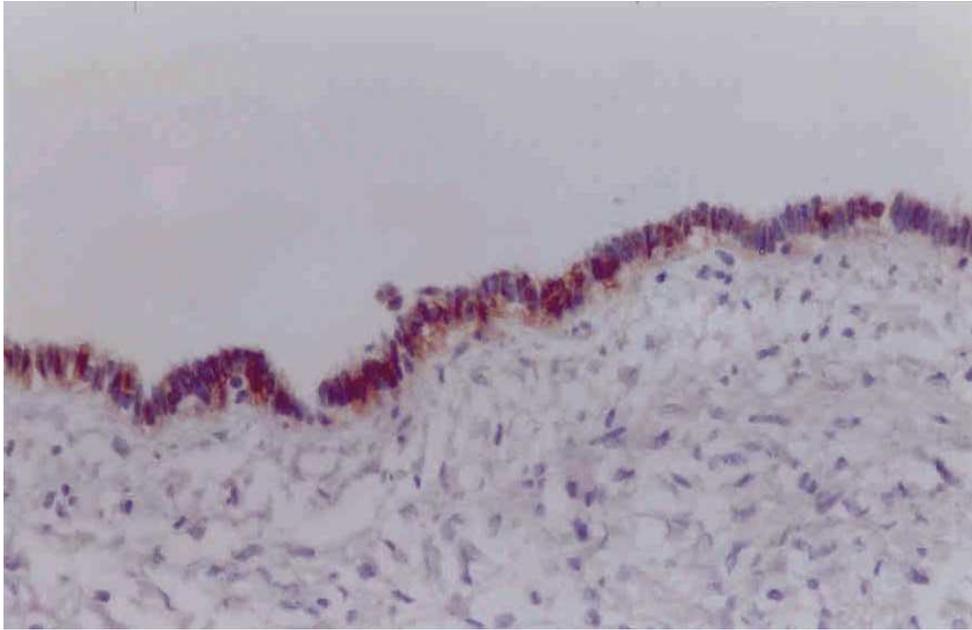


Figura 7- Adenoma seroso intensamente positivo para N-caderina. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

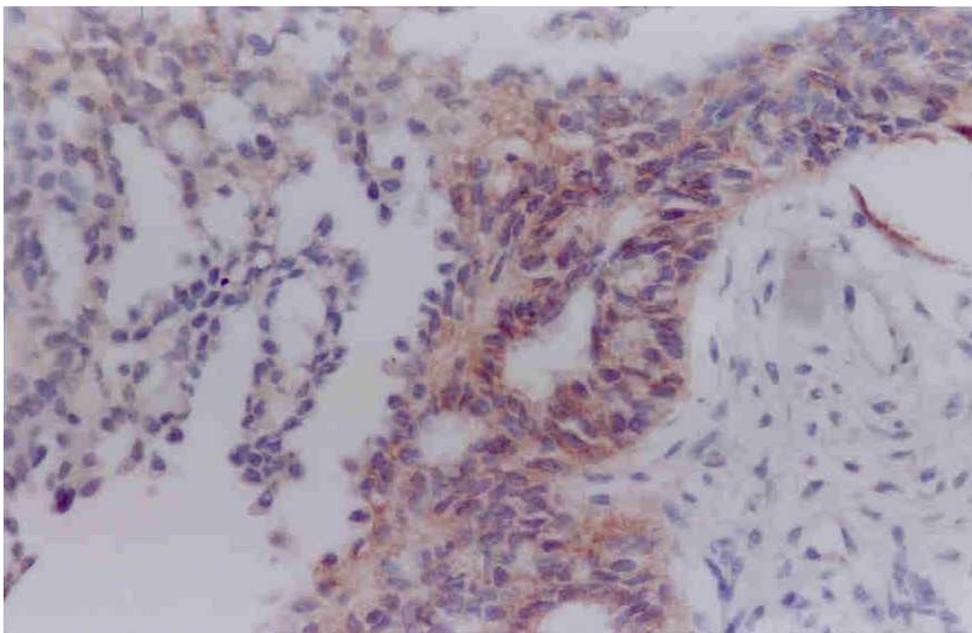


Figura 8- Adenocarcinoma seroso, estágio Ia, mostrando marcação citoplasmática para N-caderina; intensidade da reação de fraca à moderada. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

EXPRESSÃO DE β -CATENINA

As preparações imunoistoquímicas para detecção da β -catenina mostraram diferença quanto à intensidade da expressão desta molécula entre os grupos dos tumores malignos e benignos estudados ($p < 0,01$; TABELA 6). Reações com marcação intensa foram observadas em 18 dos 49 casos malignos (38%) e em apenas 3 dos 39 casos benignos (8%) (FIGURA 9).

Os casos que apresentaram marcação intensa para β -catenina foram, entre os malignos, 7 adenocarcinomas endometrióides, 5 adenocarcinomas mistos, 5 adenocarcinomas serosos e 1 adenocarcinoma mucoso. Entre os benignos, o mesmo foi observado em 3 adenomas serosos. Além disso, entre os adenocarcinomas mistos apresentando marcação intensa para o marcador em questão, 3 tumores continham áreas endometrióides e os outros 2, áreas com células claras (ANEXO III).

Nas células positivas para a β -catenina, verificou-se que, em 49% dos tumores malignos (24/49), a maioria de suas células expressava β -catenina, contrastando com 31% dos tumores benignos (12/39), porém não sendo esta uma diferença estatisticamente significativa. Já a marcação deslocada para o núcleo (FIGURA 10) foi observada em 9 tumores malignos, sendo estes 4 adenocarcinomas endometrióides, 2 adenocarcinomas serosos, 2 adenocarcinomas mucosos e 1 adenocarcinoma misto com área de células claras. Entre os benignos, a marcação nuclear foi observada em 3 adenomas serosos, embora estas diferenças não tenham atingido significância estatística (TABELA 6).

Quanto aos tipos histológicos, 50% (7/14) dos casos classificados como outros (adenocarcinomas mistos e carcinomas de células claras) e 72,7% dos adenocarcinomas endometrióides (8/11) apresentaram mais da metade das células marcadas positivamente para β -catenina, enquanto as porcentagens observadas para os grupos dos tumores serosos e mucosos foram mais baixas ($p = 0,01$; TABELA 6).

Diferenças quanto à intensidade da reação encontrada nos diferentes grupos histológicos também foram identificadas como significantes ($p = 0,04$; TABELA 6).

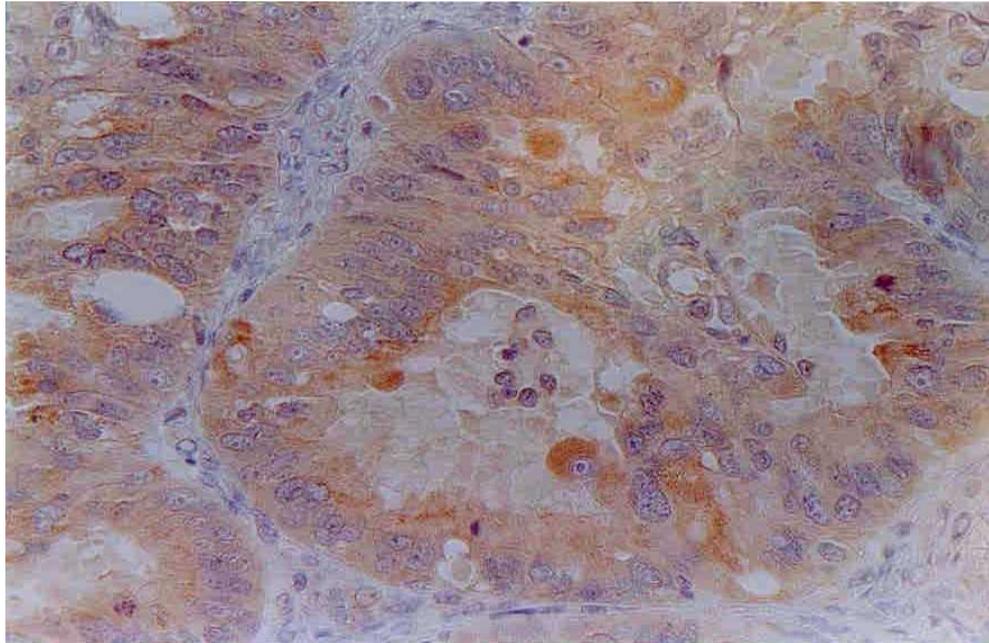


Figura 9- Adenocarcinoma endometrióide, estágio IIIc, marcação intensa para β -catenina; 100% das células observadas apresentam-se positivas. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

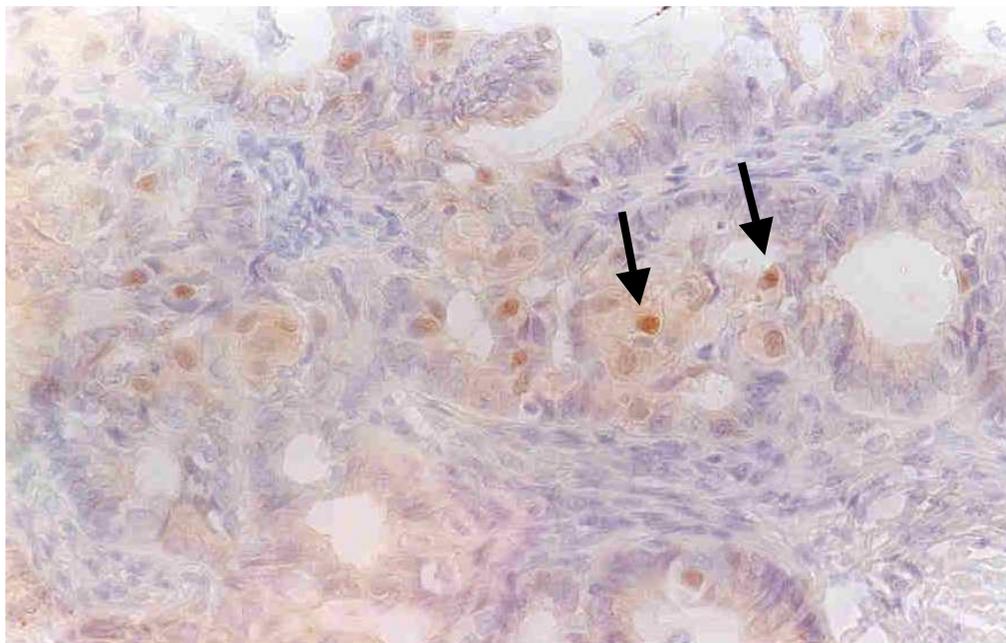


Figura 10- Adenocarcinoma endometrióide, estágio Ia, mostrando marcação citoplasmática e nuclear intensa para β -catenina. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

EXPRESSÃO DE α -CATENINA

A expressão de α -catenina foi observada em mais de 50% das células em 51% dos tumores malignos. Entre os benignos, apenas 24,3% (9/37) apresentaram a maioria das células positivas para este marcador ($p=0,04$; TABELA 7). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os tumores malignos e benignos quanto à intensidade da marcação e o padrão das estruturas celulares marcadas.

Apenas um caso entre os benignos apresentou reação considerada intensa para α -catenina, sendo que a mesma não foi observada nos carcinomas. A marcação nuclear foi observada em alguns poucos casos: 2 adenomas serosos e 3 tumores malignos (1 adenocarcinoma seroso e 2 adenocarcinomas endometrióides).

Quanto à histologia dos tumores, diferença significativa ($p<0,01$) foi encontrada para o padrão de estruturas celulares marcadas nos diferentes grupos (TABELA 7). Metade dos tumores do grupo de carcinomas mistos e células claras (outros) e 56% dos tumores serosos apresentaram marcação somente no citoplasma (FIGURA 11). Nos tumores endometrióides 64% (7/11) apresentaram marcação em membrana e citoplasma simultaneamente (FIGURA 12). Nenhum dos carcinomas mistos e de células claras, assim como nenhum dos de origem mucosa, apresentaram marcação nuclear, porém sendo esta observada em 7% das neoplasias de origem serosa e em 18% das neoplasias endometrióides.

Com relação às neoplasias malignas, não foram encontradas possíveis associações entre os padrões de expressão desta molécula e o estágio tumoral, tampouco com a evolução dos casos.

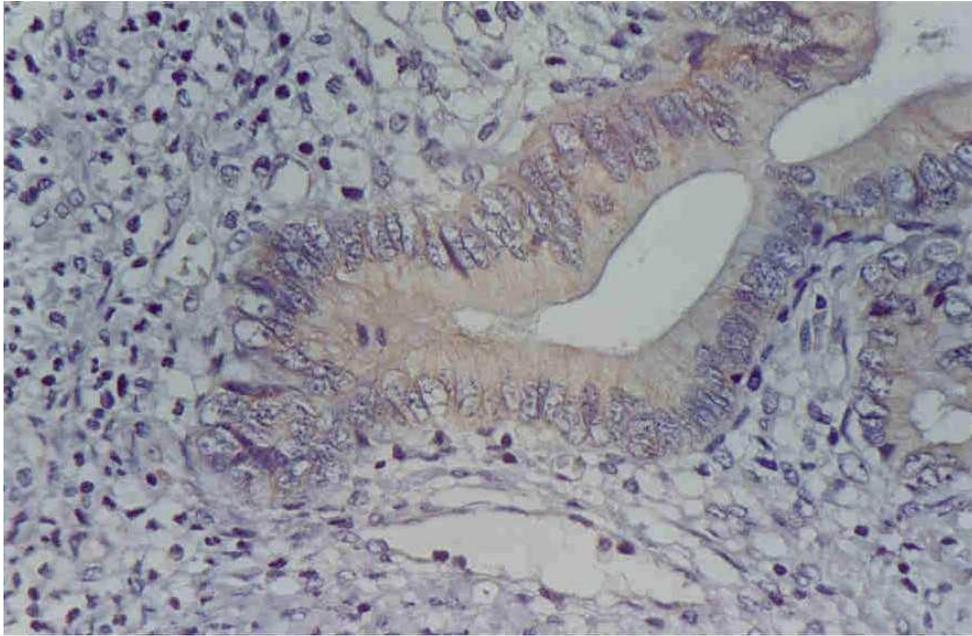


Figura 11- Adenocarcinoma mucoso, estágio Ia, mostrando marcação citoplasmática moderada para α -catenina; 100% das células mostram-se positivas. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.

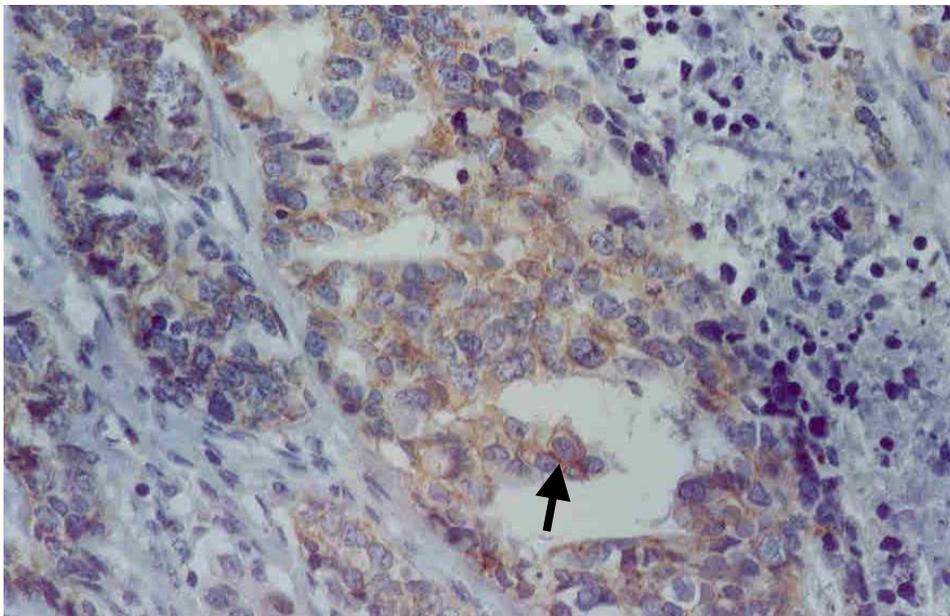


Figura 12- Adenocarcinoma seroso, estágio IIIc, mostrando marcação no citoplasma e na membrana para α -catenina. Reação de Imunoistoquímica, aumento de 400X.



DISCUSSÃO

O OSE maduro é um mesotélio simples, no qual a adesão celular é mediada pela N-caderina (WONG *et al.*, 1999). Suas células apresentam retenção das características mesenquimatosas, porém mantêm a capacidade de conversão epitélio-mesenquimal, ao longo de seu desenvolvimento (AUERSPERG *et al.*, 1994). Ao contrário do que ocorre com neoplasias em outros tecidos, nos quais a progressão tumoral é acompanhada de perda de diferenciação celular, nos carcinomas ovarianos são acionadas as propriedades morfológicas e funcionais especializadas, assemelhando-se aos epitélios provenientes dos ductos Müllerianos que compõem a trompa, o endométrio e a endocérvice. Estas propriedades incluem a aquisição de formato de células colunares, a formação de papilas e estruturas glandulares, além da expressão de CA125, E-caderina e mucina (ONG *et al.*, 2000).

No presente estudo, E- e N-caderina foram detectadas tanto nas neoplasias malignas quanto benignas, sendo 25% dos tumores malignos e 42,8% dos benignos positivos para N-caderina, enquanto 60,4% dos malignos e 78,8% dos benignos foram E-caderina positivos (TABELAS 4 e 5).

Estudos feitos em epitélio proveniente de mulheres com história familiar de câncer de ovário também apontaram a co-expressão de E- e N-caderina neste tecido, sendo que a expressão aumentada de E-caderina, em conjunto com a observação de outros marcadores de diferenciação epitelial, poderiam identificar o fenótipo de alto risco para o desenvolvimento de câncer de ovário (WONG *et al.*, 1999). Co-expressão das caderinas E e N, em áreas de contato célula-célula, foi também observada em lesões metastáticas de carcinoma de mama, em glândulas salivares, pâncreas e nódulos linfáticos axilares de modelos experimentais com camundongos (NIEMAN *et al.*, 1999).

Mais recentemente, experimentos com linhagens celulares de mama têm mostrado a participação das caderinas mesenquimais (entre elas a N-caderina) na transformação neoplásica, através da regulação da função de adesão mediada pela E-caderina, conferindo às células a capacidade de promover motilidade e invasão celulares, sensibilidade ao tratamento com fatores de crescimento e aumentando a produção de enzimas que degradam a matriz extra-celular, como a metaloproteinase-9 (MMP-9) (HAZAN *et al.*, 2000; NIEMAN *et al.*, 1999).

Evidências de interação entre caderinas e receptores de tirosina-quinases também foram encontradas, sugerindo que as mudanças na expressão das caderinas não apenas modulam o *status* da adesão celular nos tecidos neoplásicos, mas também afetam vias de transmissão de sinais, conduzindo ao fenótipo maligno (CAVALLARO et al., 2002). Em neoplasias do epitélio ovariano, estas relações não foram ainda investigadas.

O grande número de tumores malignos com expressão negativa para E-caderina encontrado neste estudo pode ser explicado pela própria constituição da amostra analisada, englobando mais espécimes em estádios mais avançados da doença (estádios III e IV), do que espécimes em estádios iniciais do processo tumoral (estádios I e II). Estudos de VEATCH et al. (1994), também mostraram que células tumorais encontradas no líquido ascítico, quando comparadas às células do respectivo tumor ovariano sólido, apresentavam um decréscimo na expressão de E-caderina, sugerindo assim que, na carcinogênese ovariana, a expressão desta molécula esteja aumentada nos estádios iniciais da doença, como parte da diferenciação mülleriana, sendo posteriormente diminuída com o avanço da doença, ocasião em que as células adquirem a capacidade de invasão e são esfoliadas para o líquido ascítico (MAINES-BANDIERA e AURSPERG, 1997). Estudos posteriores confirmaram esta hipótese (FUJIOKA et al., 2001), nos quais a expressão de E-caderina era maior nos carcinomas bem diferenciados do que nos carcinomas moderadamente ou pouco diferenciados. Constataram ainda uma expressão diminuída de E-caderina em metástases peritoneais, em comparação com as lesões ovarianas primárias. Em contrapartida, os estudos de SUNDFELDT et al. (1997) não evidenciaram redução da expressão de E-caderina nos estádios mais avançados da doença.

Uma observação interessante neste estudo foi o padrão de estruturas celulares marcadas para E-caderina nas neoplasias malignas com e sem ocorrência de recidiva tumoral. A maioria dos casos considerados livres da doença apresentou marcação de membrana, enquanto os casos com recidivas tumorais apresentaram-se, em sua grande maioria, negativos ou com coloração citoplasmática isolada. Esta observação sugere a perda de interação da E-caderina no complexo caderina-cateninas, com conseqüente comprometimento da função de adesão celular, possivelmente desencadeada por mutações no gene *CDH1*. Entretanto, estudos moleculares mostraram ser este um evento raro em

tumores ovarianos, sendo a ativação deste gene controlada por outros processos como, por exemplo, metilação do promotor gênico (RISINGER et al., 1994).

A expressão preservada na membrana celular, nos casos dos tumores malignos livres de doença, sugere a E-caderina como possível marcador de prognóstico para as neoplasias epiteliais de ovário. Assim, FUJIOKA et al. (2001), observaram expressão diminuída desta molécula em carcinomas moderadamente e pouco diferenciados, em comparação com os aqueles bem diferenciados, sugerindo o papel da E-caderina como indicador de agressividade tumoral. Em uma análise de preparações imunoistoquímicas aplicadas a biópsias de carcinomas ductais de mama (ELZAGHEID ET AL., 2002), a E-caderina também foi considerada um importante marcador de prognóstico. Neste estudo, um aumento na taxa de sobrevida foi associado à marcação intensa de membrana em pacientes pós-menopausa.

Os tumores mucosos, carcinomas endometrióides, mistos e de células claras mostraram-se, via de regra, negativos para N-caderina (TABELA 5). Esta observação sugere que os tumores mucosos, independentemente se benignos ou malignos, apresentam expressão nula da proteína, à semelhança dos carcinomas endometrióides e de células claras. Por outro lado, as neoplasias de tipo seroso, malignas ou benignas, apresentaram-se na maioria positivas para N-caderina, indicando padrão de expressão mais próximo ao do epitélio normal da superfície ovariana.

O deslocamento de marcação para o núcleo celular, associado à ocorrência de pior prognóstico nestes casos (TABELA 5), sugerem a ocorrência eventual de mutações na N-caderina, com provável perda da função de adesão celular, porém a confirmação desta hipótese requer futuros estudos em biologia molecular.

Quanto à análise das cateninas, os dados do presente estudo mostraram um aumento na expressão de β -catenina nos tumores malignos, observando-se um maior número de células coradas e reações imunoistoquímicas mais intensas para este marcador. Contudo, esta observação confronta os resultados obtidos por DAVIES et al. (1998) que relataram a ocorrência de redução ou ausência da expressão das cateninas α e β nos carcinomas ovarianos, quando comparados ao epitélio ovariano normal e aos tumores epiteliais benignos do ovário. Por outro lado, WRIGHT et al. (1999) encontrou aumento

das concentrações citoplasmáticas de β -catenina em parte dos espécimes avaliados, nas amostras de carcinomas endometrióides de ovário.

Em oposição ao relatado no presente estudo para os tumores epiteliais de ovário, a expressão citoplasmática aumentada de β -catenina foi observada em adenocarcinomas bem diferenciados de colo e reto, contrapondo-se à perda de expressão deste marcador, nos carcinomas menos diferenciados e em estágio mais avançado (VAN- AKEN et al., 1993; GAGLIARDI et al., 1995). Assim, nas neoplasias de colo e reto, o aumento de expressão da β -catenina parece ser importante durante o início do desenvolvimento tumoral, com posterior perda da expressão desta e de outras moléculas, como E-caderina, na fase de invasão tumoral (ILYAS e TOMLINSON, 1997).

Possíveis explicações para o aumento da expressão citoplasmática da β -catenina seriam: 1- a desestabilização do complexo de adesão celular, devido à ocorrência de metilação dos promotores gênicos ou mutações nos genes que codificam outras moléculas participantes do complexo (WRIGHT et al., 1999); 2- a ativação da via de sinalização Wnt, pela ocorrência de mutações no gene *APC* ou no próprio gene da β -catenina, impedindo a fosforilação da β -catenina e sua posterior degradação pela enzima GSK3 nos proteossomos (CONACCI-SORRELL et al., 2002). Em carcinomas de ovário, mutações no gene *APC* não foram identificadas. Mutações no gene *CTNNB1* também foram raramente observadas nestas neoplasias. As mutações no gene *CTNNB1* foram encontradas exclusivamente nos carcinomas ovarianos de tipo endometrióide (PALACIOS e GAMALLO, 1998), localizando-se no exon 3 deste gene. Análises de expressão gênica confirmaram que estas mutações causam a ruptura de ligação entre a enzima GSK3 e a β -catenina, havendo assim a estabilização desta no citoplasma celular (WRIGHT et al., 1999).

O mais importante quanto à participação da β -catenina na carcinogênese parece ser a sua expressão no núcleo celular. Estudos moleculares revelaram ser a β -catenina uma proteína de dupla função, atuando no complexo de adesão celular da membrana e, em paralelo, na transcrição de genes relacionados com a proliferação celular, como o *MYC* e o *CYCLIN D1* (CONACCI-SORRELL et al., 2002). Neste estudo, a marcação nuclear foi observada não apenas nos carcinomas endometrióides, mas também em tumores serosos, mucosos e em um carcinoma misto de células claras. Este achado contradiz os resultados de

WRIGHT (1999), onde a marcação nuclear para β -catenina foi exclusiva dos tumores endometrióides. Entretanto, GAMALLO et al. (1999) também encontraram, à semelhança do presente estudo, marcação nuclear para β -catenina em alguns poucos tumores serosos.

A maior intensidade observada nas reações imunoistoquímicas para as neoplasias malignas, assim como a presença de marcação citoplasmática e, em certos casos, também nuclear, sugerem que a Via Wnt esteja ativada, em alguns destes espécimes, durante a carcinogênese ovariana, estabilizando os níveis de β -catenina no citoplasma e permitindo o deslocamento desta para dentro do núcleo. Como estudos anteriores mostraram ser as mutações nos genes *CTNNB1* e *APC* eventos raramente observados em neoplasias ovarianas, novos estudos precisarão ser desenvolvidos para avaliar o *status* molecular dos genes que codificam as demais moléculas participantes da Via Wnt neste tipo de tumores.

Ainda com relação à β -catenina, diferenças estatisticamente significativas foram detectadas na comparação entre os tipos histológicos de tumor e o padrão de expressão (TABELA 6). A maioria dos tumores endometrióides e de células claras apresentaram reações mais intensas e maior número de células expressando este marcador, enquanto o mesmo só foi observado em poucos espécimes de origem mucosa e serosa. Não há estudos anteriores relatando diferenças quanto a estas duas variáveis, nos diversos tipos de neoplasias de ovário. Este achado reforça a hipótese de que diferentes subtipos histológicos de neoplasias ovarianas devem representar processos de transformação neoplásica independentes e distintos (WRIGHT et al., 1999).

Nas neoplasias malignas, não foram observadas quaisquer associações entre o estágio tumoral, evolução da doença e expressão de β -catenina, em concordância com os estudos realizados por DAVIES et al. (1998) e FUJIOKA et al. (2001). Estes resultados contrastam com os achados de GAMALLO et al. (1999) que, nos carcinomas endometrióides, encontraram marcação nuclear indicativa de melhor prognóstico, enquanto que a marcação de membrana implicaria em pior prognóstico.

No que se refere à α -catenina, não foram encontradas diferenças entre estágio tumoral, evolução da doença e a expressão funcional desta proteína, em concordância com os estudos realizados por DAVIES et al. (1998). Segundo esses autores, as cateninas α e β

estariam consistentemente expressas no ovário normal, embora com expressão reduzida ou ausente nos carcinomas ovarianos. Entretanto, outros autores encontraram manutenção da expressão de α -catenina nos carcinomas de ovário em estádios III e IV, sendo os padrões de expressão topográficos similares aos tumores primários e lesões metastáticas analisadas (ANTTILA et al., 1998; DAVIDSON et al., 2000).

A diferença entre tais estudos sugere a instabilidade da expressão de α -catenina, durante a progressão da carcinogênese. BULKHOLM e colaboradores (1998; 2000), investigando tumores de mama, sugeriram a perda inicial de expressão da E-caderina e das cateninas α e β durante o início da tumorigênese, com posterior re-expressão destas ao longo do avanço da doença.

Presença de marcação de α -catenina no núcleo e concomitante perda de expressão na membrana celular, ocorreu em cinco casos analisados, sendo dois adenomas serosos e três adenocarcinomas, um destes seroso e dois endometrióides (TABELA 7). Estudos moleculares, realizados em linhagens de carcinomas de pulmão e de ovário, evidenciaram deleções no gene da α -catenina e perda da função de adesão celular (HIRANO et al., 1992; BULLIONS et al., 1997). Embora tais relatos sejam sugestivos de associação direta entre mutação no gene da alfa-catenina e a perda de função como proteína de ligação intercelular, estudos adicionais serão necessários para averiguar esta possibilidade nos carcinomas de ovário.

O padrão de marcação citoplasmático foi freqüentemente encontrado nos tumores serosos, carcinomas mistos e de células claras, contrastando com a ausência desta manifestação nos carcinomas endometrióides. Diferenças quanto ao padrão de estruturas marcadas para α -catenina, em reações de imunoistoquímica, e os diferentes subtipos de tumores ovarianos, não foram ainda relatados. Novos estudos serão necessários, visando contemplar o comportamento peculiar dos carcinomas endometrióides e possíveis implicações sobre a evolução da doença.



CONCLUSÕES

- As caderinas E e N estão co-expressas em tumores malignos e benignos do epitélio ovariano.
- A positividade para E-caderina, presente nos adenomas e adenofibromas, sugere que a expressão desta molécula deve acontecer nas etapas iniciais da transformação neoplásica do epitélio ovariano.
- Carcinomas de estádios mais avançados são na maioria negativos para a expressão de E-caderina, sugerindo a perda desta molécula em etapas mais avançadas da carcinogênese ovariana.
- A manutenção da expressão de membrana para a E-caderina, nas neoplasias malignas de estágio menos avançado, contrastando com a expressão negativa ou citoplasmática nas mais agressivas (de estágio mais avançado), apontam para a utilização da E-caderina como bom marcador de prognóstico para neoplasias epiteliais de ovário.
- A expressão de β -catenina é maior nos carcinomas do que nos adenomas do ovário.
- Maior número de células positivas para α -catenina aparece com maior frequência nos carcinomas de ovário do que nos tumores benignos.
- A marcação nuclear para β -catenina e α -catenina sugere que estas moléculas possam participar de outras funções, além da adesão celular, na carcinogênese ovariana.
- O deslocamento da expressão de β -catenina para o núcleo, encontrado preferencialmente nos carcinomas ovarianos endometrióides, mas também nos carcinomas de células claras e serosos, sugere uma possível alteração funcional da molécula, nestes tipos histológicos.
- No presente estudo, os padrões de expressão das moléculas N-caderina, α - e β -cateninas não estiveram relacionadas com o estágio tumoral, tampouco com a ocorrência de metástases, nos casos investigados.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ANTTILA,M; KOSMA,V-M; JI,H; WEI-LING,X; PUOLAKKA,L; JUHOLA,M; SAARIKOSKI,S; SYRJÄNEN,K – Clinical significance of α -catenin, collagen IV, and Ki-67 expression in epithelial ovarian cancer. **J Clin Oncol** 16: 2591-2600, 1998.

AUERSPERG,N.; MAINES-BANDIERA,S.L.; DYCK,H.G.; KRUK,P.G. – Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. **Lab Invest**, 71: 510-518, 1994.

AVRAMEAS,S.; URIEL,J. – Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D** 13, 262(24): 2543-2545, 1966.

BERX,G.; BECKER,K.F.; HOFLEER,H.; VANROY,F. - Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. **Hum Mutat**, 12(4): 226-237, 1998.

BIXBY,J.L.; ZHANG,R. – Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. **J Cell Biol**, 110: 1253-1260, 1990.

BREMNER,R.M.; VEVE,R.; HIRSCH, F.R.; FRANKLIN,W.A. – The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. **Lung Cancer**, 36: 115-124, 2002.

BULKHOLM,I.K.; NESLAND,J.M.; KARESEN,R.; BORRESEN-DALE,A.L. – Re-expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin, but not γ -catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. **J Pathol**, 190: 15-19, 2000.

BULKHOLM,I.K.; NESLAND,J.M.; KARESEN,R.; BORRESEN-DALE,A.L. – E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. **J Pathol**, 185: 262-266, 1998.

BULLIONS,L.; NOTTERMAN,D.; CHUNG,L.; LEVINE,A. – Expression of wild-type α -catenin protein in cells with a mutant α -catenina gene restored both growth regulation and tumor suppressor activities. **Mol Cell Biol**, 17: 4501-4508, 1997.

CARVALHO,F.M. - **Manual de patologia ginecológica** – roteiros macro e microscópicos. Primeira Edição. São Paulo: Audichromo, 1995.

CAVALLARO,U.; SCHAFFHASER,B.; CHRISTOFORI,G. – Cadherin and the tumour progression: is it all in a switch? **Cancer Letters** 176: 123-128, 2002.

CHAN,J.K.C.; WONG,C.S.C. - Loss of E-cadherin is the fundamental defect in diffuse-type gastric carcinoma and infiltrating lobular carcinoma of the breast. **Adv Anat Pathol**, 8 (3): 165-172, 2001.

CHRISTOFORI,G.; SEMB,H. – The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene, **Trends Biochem Sci**, 24:73-76, 1999.

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

CONACCI-SORRELL,M.; ZHURINSKY,J.; BEN-ZE'EV,A. – The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. **J Clin Invest**, 109:987-991, 2002.

COONS,A.H.; CREECH,H.J.; JONES,R.N. – Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc Soc Exp Biol Med**, 47:

200-202, 1941.

DALY,M.; OBRAMS,G.I. – Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. **Semin Oncol**, 25: 255-264, 1998.

DARAI, E.; SCOAZEC, J.Y.; Expression of cadherins and CD44 proteins in ovarian tumors: pathophysiology and diagnosis interest. **Eur Journ Obstet Gynecol Reprod Biol**, 86: 131-133, 1999.

DAVIDSON,B.; GOTLIEB,W.H.; BEN-BARUCH,G.; NESLAND, J.M.; BRYNE,M.; GOLDBERG,I.; KOPOLOVIC,J.; BERNER,A. – E-cadherin complex protein expression and survival in ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol**, 79: 362-371, 2000.

DAVIES,B.R.; WORSLEY,S.D.; PONDER,B.A.J. - Expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin in normal ovarian epithelium and epithelial ovarian cancers. **Histopathology**, 32: 69-80, 1998.

ELZAGHEID,A.; KUOPIO,T.; ILMEN,M.; COLLAN,Y. – Prognostication of invasive ductal breast cancer by quantification of E-cadherin immunostaining: the methodology and clinical relevance. **Histopathology**, 41: 127-133, 2002.

FALINI,B.; TAYLOR,C.R. – New developments in immunoperoxidase techniques and their application. **Arch Pathol Lab Med**, 107(3):105-107, 1983.

FISHER, L.D. & VAN BELLE, G. Bioestatistics: a methodology for the health sciences. New York, Jonh Wiley & Sons, 1993. 991 p.

FUJIOKA,T; TAKEBAYASHI,Y; KIHANA,T; KUSANAGI,Y; HAMADA,K; OC,H; UCHIDA,T; FUKUMOTO,M; ITO,M – Expression of E-cadherin and beta-catenin in primary and peritoneal metastatic ovarian carcinoma. **Oncol Rep** 8(2): 249-255, 2001.

GAGLIARDI,G; KADEMIR,O; LIU,D et al. Changes in E-cadherin immunoreativity in the adenoma-carcinoma sequece of the large bowel. **Virchows Arch** 426:149-154, 1995.

GAMALLO,C.; PALACIOS,J.; MORENO,G.; DE MORA,J.C.; SUÁREZ,A.; ARMAS,A. - β -catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas relationship with β -catenin gene mutations, clinicaopathological features, and clinical outcome. **Am J Pathol**, 155: 527-536, 1999.

GIRALD,L.A.; SCHALKEN,J.A. – Decreased expression of the intercellular adhesion molecule E-cadherin in prostate cancer: biological significance and clinical implications. **Cancer Metast Rev**, 12: 29-37, 1993.

GOODSELL,D.S. – The molecular perspective: cadherin. **Stem Cells**, 20: 583-584, 2002.

GREENLEE,R.T.; MURRAY,T.; BOLDEN,S.; WINGO,P.A. – Cancer statistics, 2000. **CA Cancer J Clin**, 50: 7-33, 2000.

HARTGE,P.;WHITTEMORE,A.S.; ITNYRE,J.; MCGOWAN,L.; CRAMMER,D. – rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. **Obstet Gynecol**,

80: 19-26, 1994.

HAZAN,R.B.; KANG,L.; WHOOLEY,B.P.; BORGEM,P.I. – N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. **Cell Adhes Commun**, 4: 399-411, 1997.

HAZAN,R.; PHILLIPS,G.; QIAO,G.; NORTON,L.; AARONSON,S. – Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. **J Cell Biol**, 148:779-790, 2000.

HIRANO, S.; KIMOTO,N.; SHIMOYAMA,Y.; HIROHASHI,S.; TAKEICHI,M. – Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicelular organization. **Cell**, 70: 293-301, 1992.

HUTTENLOCHER,A.; LAKONISHOK,M.; KINDER,M.; WU,S.; TRUONG,T.; KNUDSEN,K.A.; HORWITZ,A.F. – Integrin and cadherin in synergy regulates contact inhibition of migration and cell motile activity. **J Cell Biol**, 141: 515-526, 1998.

ILYAS,M.; TOMLINSON,I.P.M. - The interactions of APC, E-cadherin and β -catenin in tumor development and progression. **J Pathol**,182: 128-137, 1997.

ILYAS,M. - Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumor metastasis? **J Pathol**, 190: 3-5, 2000.

INCA – Instituto Nacional do Câncer – Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil: banco de dados. Disponível em : < [http : // www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 20 abril, 2003.

ISLAM,S.; CAREY T.E.; WOLF,G.T.; WHEELLOCK,M.J.; JOHNSON,K.R. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. **J Cell Biol**, 135: 1643-1654, 1996.

JORDE,L.B., CAREY,J.B.; BAMSHAD,M.J.; WHITE,R.L. - **Genética Médica**. Segunda Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

MAINES-BANDIERA,S.L.; AUERSPERG,N. – Increased E-cadherin expression in ovarian surface epithelium: an early step in metaplasia and dysplasia? **Int J Gynecol Pathol**, 16: 250-255, 1997.

MILLER,J.R.; HOCKING,A.M.; BROWN,J.D.; MOON,R.T. - Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways. **Oncogene**, 18: 7860-7872, 1999.

NIEMAN,M.; PRUDOFF,R.; JONSON,K.; WHEELOCK,M. – N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. **J Cell Biol**, 147: 631-644, 1999.

ONG,A.; MAINES-BANDEIRA,S.; ROSKELLEY C.D.; AUERSPERG, N. - An ovarian adenocarcinoma line derived from SV 40/ E-cadherin-transfected normal human ovarian surface epithelium. **Int J Cancer**, 85: 430-437, 2000.

PALACIOS, J.; GAMALLO, C. - Mutations in the β -catenin (CTNNB) in endometrioid ovarian cancers. **Cancer Res**, 58: 1344-1347, 1998.

PEIFER,M. - Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. **Science**, 275: 1752-53,1997.

PEIFER,M.; POLAKIS,P. - Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis – a look outside the nucleus. **Science**, 287: 1606-1609, 2000.

PECORELLI,S.; BENEDET,J.L.; CREASMAN,W.T.; SHEPHERD,J.H. – FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. **Int J Gynaecol Obstet**, 65(3): 243-249, 1999.

RIEHL,R.K.; JOHNSON,R.; BRADLEY,G.B.; GRUNWALD,E.; CORNEL,E.; LILIENBAUM,A.; HOLT,C.E. - Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. **Neuron**, 17: 837-848, 1996.

RISINGER,JI; BERCHUCK,A; KOHLER, MF; BOYD, J. – Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. **Nature Genet** 7: 98-102, 1994.

ROSENTHAL,A.; JACOBS,I. – Ovarian cancer screening. **Semin Oncol**, 25(3): 315-325, 1998.

ROSSING,M.A.; DALING,J.R.; WEISS,N.S.; MOORE D.E.; SELF,S.G. – Ovarian tumors in a cohort of infertile women. **N Engl J Med**, 331: 771-776, 1994.

SCULLY,R.E.; SOBIN,L.H.; FOX,H.; RUSSEL,P.; SAKSELA, E.; SASANO, N.; TALERMAN,A. – **International histological typing of ovarian tumours**. Second Edition. Germany: Springer-Verlag, Heidelberg, 1999.

SEIDAL,T.; BALATON,A.J.; BATTIFORA,H. – Interpretation and quantification of immunostains. **Am J Surg Pathol**, 25(9): 1204-1207, 2001.

SHELLING,N.A.; COOKE,I.E.; GANESAN,T.S. - The genetic analysis of ovarian cancer. **Br J Cancer**, 72(3): 521-527, 1995.

SHIOZAKI,H.; OKA,H.; INOUE,M.; TAMURA,S.; MONDEN,M. – E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. **Cancer**, 77 (8) supplement: 1605-1613, 1996.

SMITH,M.E.F.; PIGNATELLI,M. - The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/ catenin complex. **Histopathology**, 31: 107-111, 1997.

STERNBERGER,L.A. – The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem*, 27(12): 1657, 1979.

SUNDFELDT,K.; PIOTKEWITZ,Y.; IVARSSON,K.; NILSON,O.; HELLBERG,P.; BRÄNNSTRÖM,M.; JANSON,P.; ENERBÄCK,S.; HEDIN,L. – E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. **Int J Cancer (Pred Oncol)**, 74: 275-280, 1997.

TAMURA, S. - The E-cadherin-mediated cell-cell adhesion system in human cancers. **Br J Surg**, 84: 899-900, 1997.

TORTOLERO-LUNA,G.; MITCHELL,M.F. – The epidemiology of ovarian cancer. **J Cell Biochem**, 55: 200-207, 1995.

VAN-AKEN,J; CUVELIER,CA; DE-WEVER,N et al. Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in human colorectal tumours. **Pathol Res Pract** 189: 975-978, 1993.

VAN DIEST,P.J.; VAN DAM,P.; HENZEN-LOGMANS,S.C.; BERNS,E.; VAN DER BURG,M.E.L.; GRREN,J.; VERGOTE,I. – A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. **J Clin Pathol**, 50(10): 801-804, 1997.

VASIOUKHIN,V.; BAUER,C.; DEGENSTEIN,L.; WISE,B.; FUCHS,E. – Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of α -catenin in skin. **Cell**, 104: 605-617, 2001.

VEATCH,AL; CARSON,LF; RAMAKRISHNAN,S – Differential expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells. **Int J Cancer** 58: 393-399, 1994.

WONG,A.S.T.; MAINES-BANDEIRA,S.L.; ROSEN,B.; WHEELLOCK,R.J.; LEUNG, P.C.K.; ROSKELLEY,C.D.; AUERSPERG,N. - Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. **Int J Cancer**, 81: 180-188, 1999.

WRIGHT,K.; WILSON,P.; MORLAND,S. et al. - β -catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumors. **Int J Cancer**, 82: 625-629, 1999.



ANEXOS

ANEXO I

Descrição da amostra segundo suas características clínicas e histo-patológicas

Idade (anos)	Tipo Histológico	Estádio Clínico ao diagnóstico	Seguimento	Evolução Clínica	
4349/98	38	Adenocarcinoma endometrióide	Ic	4 anos	Livre da doença
8720/95	43	Adenocarcinoma endometrióide	IIIc	5 anos	Recidiva
1882/96	48	Adenocarcinoma endometrióide	IIIc	5 anos	Livre da doença
9323/95	50	Adenocarcinoma endometrióide	IIIc	5 anos	Recidiva
5438/94	50	Adenocarcinoma endometrióide	Ia	8 anos	Livre da doença
315/95	56	Adenocarcinoma endometrióide	Ia	6 anos	Livre da doença
3698/97	59	Adenocarcinoma endometrióide	Ia	Perdido	Perdida
4494/99	64	Adenocarcinoma endometrióide	IIIc	1 ano	Recidiva
2246/97	72	Adenocarcinoma endometrióide	IIIc	2 anos	Recidiva
3157/94	73	Adenocarcinoma endometrióide	IIIc	1 ano	Recidiva
11278/95	76	Adenocarcinoma endometrióide	IIa	6 anos	Livre da doença
2943/96	30	Adenocarcinoma misto	IIIc	2 anos	Recidiva
10372/94	39	Adenocarcinoma misto	IIIc	7 anos	Recidiva
11768/96	41	Adenocarcinoma misto	IIIc	1 ano	Recidiva
361/97	43	Adenocarcinoma misto	IIIc	5 anos	Livre da doença
4726/97	45	Adenocarcinoma misto	IIIc	2 anos	Recidiva
3878/98	49	Adenocarcinoma misto	Ic	4 anos	Livre da doença
1553/94	55	Adenocarcinoma misto	IIIc	2 anos	Recidiva
8636/95	58	Adenocarcinoma misto	IIIc	5 anos	Recidiva
6925/98	69	Adenocarcinoma misto	IIb	1 mês	Recidiva
2196/97	71	Adenocarcinoma misto	IIa	6 anos	Recidiva
3304/00	72	Adenocarcinoma misto	IV	1 ano	Recidiva
7743/98	30	Adenocarcinoma mucoso	Ia	4 anos	Livre da doença
10754/95	40	Adenocarcinoma mucoso	Ic	Perdido	Perdida
9149/94	43	Adenocarcinoma mucoso	IIIc	4 meses	Recidiva
11627/95	50	Adenocarcinoma mucoso	Ib	5 anos	Recidiva
1221/00	52	Adenocarcinoma mucoso	Ic	3 anos	Livre da doença
8074/00	53	Adenocarcinoma mucoso	Ia	3 anos	Livre da doença
8256/01	59	Adenocarcinoma mucoso	Ic	2 anos	Livre da doença
2782/00	37	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3 anos	Recidiva
12984/96	40	Adenocarcinoma seroso	IIIc	2 anos	Recidiva
7324/95	41	Adenocarcinoma seroso	Ic	7 anos	Livre da doença
7323/95	42	Adenocarcinoma seroso	IIIc	5 anos	Livre da doença
10605/95	42	Adenocarcinoma seroso	IIIc	1 ano	Recidiva
10469/94	46	Adenocarcinoma seroso	IV	3 anos	Recidiva
2988/97	47	Adenocarcinoma seroso	IIIa	6 anos	Livre da doença
1059/94	51	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3 anos	Recidiva
12575/96	53	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3 anos	Recidiva
9861/94	56	Adenocarcinoma seroso	IIIc	1 ano	Recidiva
9920/00	59	Adenocarcinoma seroso	Ib	2 anos	Livre da doença
9172/96	61	Adenocarcinoma seroso	IIIb	6 anos	Livre da doença
10180/96	62	Adenocarcinoma seroso	IIIc	5 anos	Recidiva
9821/94	64	Adenocarcinoma seroso	IIc	8 anos	Livre da doença
7471/98	65	Adenocarcinoma seroso	IIIc	1 ano	Recidiva
10188/95	68	Adenocarcinoma seroso	Ia	5 anos	Livre da doença
1749/95	85	Adenocarcinoma seroso	IIIc	11 meses	Recidiva

5028/97	43	Carcinoma de células claras	Ia	5 anos	Livre da doença
8892/00	50	Carcinoma de células claras	Ia	1 ano	Recidiva
8332/99	67	Carcinoma de células claras	IIIc	3 anos	Recidiva
4417/98	58	Adenoma mucoso		3 anos	Livre da doença
3916/99	36	Adenoma mucoso		4 anos	Livre da doença
1708/97	25	Adenoma mucoso		1 mês	Livre da doença
12298/99	43	Adenoma mucoso		2 dias	Livre da doença
09/01	47	Adenoma mucoso		2 anos	Livre da doença
469/01	48	Adenoma mucoso		3 meses	Livre da doença
6697/00	49	Adenoma mucoso		2 dias	Livre da doença
11996/97	53	Adenoma mucoso		2 meses	Livre da doença
9892/97	53	Adenoma mucoso		3 dias	Livre da doença
6378/99	56	Adenoma mucoso		1 ano	Livre da doença
8546/99	56	Adenoma mucoso		1 ano	Livre da doença
9651/97	65	Adenoma mucoso		3 dias	Livre da doença
3293/98	76	Adenoma mucoso		1 mês	Livre da doença
264/97	13	Adenoma seroso		2 anos	Livre da doença
1257/97	14	Adenoma seroso		4 dias	Livre da doença
11805/97	14	Adenoma seroso		2 anos	Livre da doença
8347/00	17	Adenoma seroso		1 mês	Livre da doença
11355/97	27	Adenoma seroso		1 ano	Livre da doença
11610/99	30	Adenoma seroso		1 ano	Livre da doença
5871/99	33	Adenoma seroso		1 ano	Livre da doença
6402/99	36	Adenoma seroso		2 dias	Livre da doença
11716/98	38	Adenoma seroso		2 anos	Livre da doença
384/97	39	Adenoma seroso		3 dias	Livre da doença
10962/98	41	Adenoma seroso		1 ano	Livre da doença
1234/00	42	Adenoma seroso		2 dias	Livre da doença
11192/98	47	Adenoma seroso		4 anos	Livre da doença
2597/99	50	Adenoma seroso		4 anos	Livre da doença
5989/99	52	Adenoma seroso		3 anos	Livre da doença
1125/00	54	Adenoma seroso		1 mês	Livre da doença
7711/00	57	Adenoma seroso		19 dias	Livre da doença
10035/00	59	Adenoma seroso		3 meses	Livre da doença
5361/99	59	Adenoma seroso		5 anos	Livre da doença
1661/01	60	Adenoma seroso		1 ano	Livre da doença
9431/00	64	Adenoma seroso		1 mês	Livre da doença
12753/98	65	Adenoma seroso		3 anos	Livre da doença
9480/99	68	Adenofibroma seroso		2 dias	Livre da doença
2232/97	73	Adenoma seroso		2 anos	Livre da doença
12208/99	74	Adenoma seroso		1 ano	Livre da doença
7595/98	77	Adenoma seroso		2 dias	Livre da doença

ANEXO II

1- Estadiamento dos carcinomas de ovário segundo critérios da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia)

Estádio I: Limitado aos ovários

- Ia** Crescimento limitado a um ovário, ascite negativa para as células tumorais, cápsula intacta e ausência de tumor na superfície
- Ib** Crescimento limitado aos dois ovários, ascite negativa para células tumorais, cápsula intacta e ausência de tumor na superfície
- Ic** Tumor classificado como Ia ou Ib, mas com áreas tumorais presentes na superfície de um ou ambos os ovários, ou ruptura da cápsula, ou ascite ou lavagem peritoneal positiva para células tumorais

Estádio II: Crescimento envolvendo um ou ambos os ovários com extensão pélvica

- IIa** Extensão (implantes) e/ou metástases para o útero e tuba uterina
- IIb** Extensão (implantes) para outro tecido da pelve
- IIc** Tumor classificado como IIa ou IIb, mas com áreas tumorais presentes na superfície de um ou ambos os ovários, ou ruptura da cápsula, ou ascite ou lavagem peritoneal positiva para células tumorais

Estádio III: Tumor envolvendo um ou ambos os ovários com implantes extra-pélvicos e/ou nódulos inguinais e/ou retroperitoneais positivos

- IIIa** Tumor limitado a pelve com nódulos negativos e confirmação histopatológica de contaminação com células tumorais das superfícies do peritônio abdominal ou extensão mesentérica
- IIIb** Tumor em um ou ambos os ovários com implantes confirmados histopatologicamente, metástase peritoneal não excedendo 2 cm de diâmetro, nódulos negativos
- IIIc** Metástase peritoneal além da pelve, maior que 2 cm em diâmetro e/ou nódulos positivos

Estádio IV: Crescimento envolvendo um ou ambos os ovários com metástases distantes

Modificado por PECORELLI et al., 1999.

2- Classificação histológica dos tumores do grupo do epitélio de superfície e do estroma adjacente, segundo critérios da OMS (Organização Mundial da Saúde)

Os tumores agrupados como epiteliais-estromais são originários do epitélio de superfície ovariana (OSE) ou de seus derivados (epitélio glandular e estroma adjacente), sendo classificados histologicamente segundo 3 critérios:

1) Quanto à diferenciação assumida pelas células neoplásicas:

Serosos – Tumores compostos por epitélio que se assemelha ao das trompas uterinas.

Mucosos – Tumores compostos por epitélio que se assemelha ao da endocérvice ou ao epitélio gastrointestinal.

Endometrióides – Tumores cujo epitélio se assemelha ao endométrio.

Células claras – Considerado um tipo de metaplasia do epitélio endometrióide. São tumores compostos por células claras, semelhantes às células do carcinoma renal, porém de origem mülleriana, célula do tipo “*hobnail*” (caracterizada pelo citoplasma amplo e grande núcleo celular) formando pequenos cistos ou túbulos e, ocasionalmente, apresentando-se como células em anel de sinete, células oxifílicas e células cuboidais achatadas não específicas, podendo haver ainda a combinação destes tipos celulares.

Células transicionais – Tumores que se assemelham ao tipo de células transicionais do urotélio.

Mistos – Tumores compostos por uma mistura de dois ou mais dos tipos descritos acima.

Indiferenciados – Tumores malignos do tipo epitelial tão pouco diferenciados que não podem ser enquadrados em nenhuma das categorias anteriormente citadas.

2) Quanto ao potencial de malignidade:

Benignos – Tumores com baixa proliferação celular e baixo grau de atipia celular; confinados ao ovário e que não apresentam capacidade invasiva.

Malignos – Tumores que apresentam atipia nuclear, entre outras atipias celulares, alta atividade mitótica; capazes de invadir o estroma ovariano e estruturas adjacentes, podendo

haver destacamento de agrupamentos celulares do sítio tumoral primário, formando implantes e focos de invasão à distância.

Borderline – Tumores de baixo potencial maligno. Apresentam algumas, mas não todas as características morfológicas dos tumores malignos: maior proliferação representada pela estratificação celular, atipia nuclear leve a moderada, presença de mitoses, ausência de invasão tecidual destrutiva. Têm comportamento intermediário entre aquele observado para o grupo dos tumores benignos e o dos tumores malignos.

3) Quanto à apresentação macroscópica do tumor:

Cistos – O prefixo “cisto” é usado na nomenclatura dos tumores quando há formação de cistos macroscopicamente identificáveis, ainda que focais.

Papilas – Tumores que formam hastes papilíferas têm acrescentado à sua nomenclatura o adjetivo “papilífero”.

Fibromas - O sufixo “fibroma” é utilizado na nomenclatura de tumores onde o componente estromal predomina, focal ou difusamente, apresentando conseqüentemente aspecto fibroso e endurecido.

Modificado de SCULLY et al., 1999 e Carvalho, 1995.

ANEXO III

ANEXO IV

ANEXO V

Detalhamento sobre os componentes histológicos dos adenocarcinomas mistos incluídos na amostra

No da Amostra	Tumores Mistos – Histologia
10372/94	Adenocarcinoma misto: seroso e mucoso
2943/96	Adenocarcinoma misto: seroso e mucoso
1553/94	Adenocarcinoma misto com áreas endometrióides
11768/96	Adenocarcinoma misto: mucoso e endometrióide
4726/97	Adenocarcinoma misto: mucoso e endometrióide
6925/98	Adenocarcinoma misto: mucoso e endometrióide
8636/95	Adenocarcinoma misto: seroso e de células claras
2196/97	Adenocarcinoma misto: seroso e de células claras
3878/98	Adenocarcinoma misto: seroso e endometrióide
3304/00	Adenocarcinoma misto: mucoso, seroso e de células claras
361/97	Adenocarcinoma misto: endometrióide e de células transicionais