Shigeki Kusamura

Diagnóstico histológico e expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34 em pacientes portadoras de tumor de células da granulosa do ovário

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain
Co orientadora: Profa. Dra. Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade

UNICAMP
2001

Shigeki Kusamura

Diagnóstico histológico e expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34 em pacientes portadoras de tumor de células da granulosa do ovário

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

Orientadora: Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain

Co orientadora: Profa. Dra. Liliana Ap. Lucci De Angelo Andrade

UNICAMP
2001

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

K968d

Kusamura, Shigeki
Diagnóstico histológico e expressão dos marcadores p53 c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34 em pacientes portadoras de tumor de células da granulosa do ovário / Shigeki Kusamura. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Sophie Françoise Mauricette Derchain, Liliana Aparecida Lucci De Ângelo Andrade
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ovários - Tumores. 2. Marcadores Biológicos. I. Sophie Françoise Mauricette Derchain. II. Liliana Aparecida Lucci De Ângelo Andrade. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: SHIGEKI KUSAMURA

Orientadora: Profa. Dra. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

Co-Orientadora: Profa. Dra. LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE

Membros:

1.

2.

3.

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

Data: 10/9/2001

Agradecimento: FAPESP número 00/09504-1

Dedico esta Dissertação

*Aos meus pais **Tetsuro** e*
***Fumiko** por todo amor e dedicação com*
que me criaram.

*Aos meus irmãos **Keiko**, **Yoshiya** e*
***Patrícia** pelos incentivos incondicionais.*

Agradecimentos

*À **Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain**, não somente pelos seus inestimáveis ensinamentos e incentivos prestados enquanto orientadora, mas principalmente pela amizade e papel fundamental que desempenhou na minha formação médica e científica.*

*À **Profa. Dra. Liliana Aparecida Lucci De Ângelo Andrade,** pelas valiosas orientações e principalmente pelo fato de ter sido a responsável pela etapa mais árdua deste trabalho.*

*Ao brilhante **Dr. Kari J. Syrjänen**, tanto pelas suas importantes colocações que suscitaram o debate e a origem do presente estudo, quanto pela sua participação efetiva na análise dos casos.*

*Ao **Dr. Marcelo Alvarenga** por toda atenção e auxílio prestados no estudo dos casos.*

*À **Dra. Cristiane Pereira Gomes,** pelo empenho e apoio prestados em momentos cruciais deste trabalho.*

*À **Dra. Gláucia, Marisa, Rose** e **Cristian**, do Laboratório de Patologia Experimental, pelo carinho e dedicação na consecução da parte técnica do estudo.*

*Ao **Dr. Luís Bahamondes, Sra. Margarete Amado de Souza Donadon** e demais professores da Pós-Graduação, pelas contribuições fundamentais que viabilizaram a execução deste trabalho e também pelas lições de metodologia e pesquisa.*

*Aos amigos **Edson** e **Gislaine**, importantíssimos colaboradores, dos quais pretendo continuar recebendo grandes ensinamentos em estatística.*

*À **Sra. Sueli Chaves** e todos os **membros da ASTEC,** pelos árduos esforços na finalização deste trabalho.*

*Ao **Dr. Luiz Carlos Teixeira, Dr. César Cabello dos Santos, Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz** pelas valiosas correções e grandes lições de medicina e ciência.*

*Aos **professores e amigos da Área de Oncologia,** pelos auxílios e contribuições.*

*Aos grandes amigos **Dr. Toninho, Torres, Eiji, Priscila, Lilian, João Gilberto** e **Adriana,** pelos incentivos e carinho de todos os dias.*

Si cura meglio dove si fa ricerca

Umberto Veronesi

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução 1

2. Objetivos 12
   2.1. Objetivo geral 12
   2.2. Objetivos específicos 12

3. Sujeitos e Métodos 13
   3.1. Desenho do estudo 13
   3.2. Seleção dos sujeitos 13
   3.3. Definição de variáveis 14
   3.4. Métodos 16
   3.5. Instrumento para coleta dos dados 20
   3.6. Processamento e análise dos dados 20
   3.7. Aspectos éticos 21

4. Resultados 22

5. Discussão 31

6. Conclusões 43

7. Referências Bibliográficas 45

8. Bibliografia de Normatizações 62

9. Anexos 63
   9.1. Anexo 1 63
   9.2. Anexo 2 67
   9.3. Anexo 3 75

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AAA	Alta atividade angiogênica
AIP	Alto índice de proliferação celular
BAA	Baixa atividade angiogênica
Bil	Bilateral
BIP	Baixo índice de proliferação celular
CE	Carcinoma endometrióide
c-erbB-2	Oncogene
CI	Carcinoma indiferenciado
CMA	Campos de maior aumento em microscopia óptica
cm	Centímetro
δ	Polimerase delta
EGF	*Epidermal growth factor* (fator de crescimento epidermal)
FISH	Hibridização *in situ* por fluorescência
GCTO	*Granulosa cell tumor of ovary*
H&E	Hematoxilina e eosina
IHQ	Reação de imuno-histoquímica com a técnica de imunoperoxidase
ε	polimerase ípsilon
kDa	Kilodalton
Ki-67	anticorpo antiproteína não histônica utilizada como marcador de proliferação celular

mm^2	milímetro quadrado
NS	não significante
NSE	enolase neurônio específica
p53	Gene supressor de tumor p53
PS	Perda de Seguimento
Pan-Hta	Histerectomia total abdominal e salpingo-ooforectomia
PCNA	*Proliferating Cell Nuclear Antigen*
QT	Quimioterapia
SAS	*Statistical Analysis System*
Sig	Significante
TCA	Tumor da teca e da granulosa
TCGO	Tumor de células da granulosa do ovário
VCD	Vivas com doença em atividade
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VSD	Vivas sem doença em atividade
Seg	Seguimento

Resumo

Objetivo: investigar em tumores de células da granulosa do ovário (TCGO) a credibilidade de seu diagnóstico com coloração H&E e a expressão do p53 mutante, do c-erbB-2, Ki-67, PCNA e a atividade angiogênica (CD34), bem como as correlações destes marcadores com características clínicas e histológicas. ***Sujeitos e método*****:** Três patologistas (A,B e C) reavaliaram os 22 casos de TCGO tratados no CAISM/UNICAMP nos últimos 12 anos, sendo os marcadores detectados através de imuno-histoquímicas em cortes histológicos preparados a partir de blocos de parafina. Foram calculados os coeficientes *kappa* para avaliação da concordância interobservador entre os patologistas. A análise de associação entre as variáveis categóricas foi realizada com o teste exato de Fisher e entre variáveis categóricas e contínuas, com teste de Mann-Whitney. ***Resultados:*** Vinte e um casos foram confirmados como TCGO. Quatro casos foram diagnosticados como TCGO, mesmo sem unanimidade entre os patologistas devido à imunorreatividade para a inibina. Os coeficientes *kappa* foram de 0,42 (IC95%: -0,05; 0,88); 0,50 (IC95%: 0,13; 0,86); 0,24 (IC95%: -0,14 a 0,61), respectivamente para as duplas de patologistas A/B, A/C

e B/C. A IHQ para os marcadores foi realizada em 18 pacientes. Nove (50%) pacientes apresentaram tumores <10cm. Treze (72%) pacientes apresentaram algum componente sólido difuso/sarcomatóide. Em 12 (66%) casos a atipia celular era ausente/leve e em 6 (33%) casos, moderada/intensa. A contagem mitótica foi $\leq$ 2/10 CMA em 14 (78%) casos. Seis (33%) pacientes apresentaram extensão extra-ovariana da doença (estádios III/IV). O seguimento médio foi de 45,3 meses (0,7 a 128,8). Uma, zero e 11 pacientes apresentaram expressão para o p53 mutante, c-erbB-2 e Ki-67 (focal), respectivamente. Quatorze (78%) casos foram classificados como de alto índice de proliferação, quando avaliados pelo PCNA. A densidade microvascular média foi de 29,0/mm^2 (CI95%: 21,8 a 36,1). Apenas o Ki-67, PCNA e o CD34 foram expressos em níveis adequados para uma adequada correlação com outras variáveis. Não houve associação estatisticamente significante entre o índice de proliferação dos tumores (avaliada pelo PCNA), ou Ki-67 ou densidade microvascular com o tamanho do tumor, extensão extra-ovariana da doença, atividade mitótica, atipia celular e padrão histológico. ***Conclusão***: Em nossa casuística, o estudo dos TCGO através da IHQ revelou neoplasias cujo mecanismo de desenvolvimento aparentemente não envolve mutações do p53 e nem expressão aumentada do c-erbB-2; apresentaram resultados conflitantes no que diz respeito ao índice de proliferação celular conforme foram avaliados pelo Ki-67 ou PCNA e, finalmente, são pouco angiogênicos quando avaliados pelo CD34.

Summary

The purpose of this study was to investigate the credibility of diagnosis of granulosa cell tumor of ovary (GCTO) through the morphological evaluation employing only H&E staining. We also evaluated the expression of mutant p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA as well as angiogenic activity (CD34) and the correlation of these variables with clinical and histological characteristics. Three well trained pathologists (A, B, and C) reevaluated the slides of 22 GCTO patients that had been treated and followed at the CAISM/UNICAMP in the last 12 years. The interobserver agreement was studied calculating *kappa* coefficient. We employed the Fisher Exact test to assess the correlation between categorical variables and the Mann-Whitney test for the correlation between categorical and continuous variables. Twenty one cases were deemed GCTO after evaluation. Four cases received the diagnosis of GCTO due to positive reaction to inhibin, despite the divergent opinion of one the pathologist. The *kappa* coefficients were 0.42 (IC95%: -0.05; 0.88); 0.50 (IC95%: 0.13; 0.86); and 0.24 (IC95%: -0.14 a 0.61), for pairs A/B, A/C and B/C observers, respectively. We performed immunohistochemistry for the biological markers in 18 cases. Concerning the

clinical and histological variables: 9 (50%) patients presented tumor size <10cm; 13 (72%) patients presented some solid diffuse/sarcomatoid pattern; 12 (66%) cases presented no/slight atypia and 6 (33%) cases presented moderate/strong atypia; 14 cases presented $\leq$ 2 mitoses/10 HPF; 6 (33%) patients presented extraovarian extension of the disease (stage III/IV). The mean follow-up was 45.3 months (range: 0.7 to 128.8). One, 0 and 11 cases presented positive expression for mutant p53, c-erbB-2 e Ki-67 (focal), respectively. Fourteen (78%) cases were classified as high proliferating index when evaluated by PCNA. The mean microvascular density was 29,0/mm^2(IC95%: 21,8 to 36,1). Only Ki-67, PCNA and CD34 were expressed at adequate levels for further correlation with other variables. There was no statistically significant link between either the PCNA proliferating index or the Ki-67 expression or microvascular density with tumor size, extraovarian extension of disease, mitotic activity, cellular atypia and histological pattern. We concluded that the diagnosis of GCTO is difficult in some cases, suggesting the evaluation be complemented with a panel of markers such as inhibin. We also verified that GCTO is a neoplasm that apparently did not involve mutations of p53 nor overexpression/amplification of c-erbB-2; presented conflictings results concerning the proliferating activity when evaluated by PCNA and Ki-67; and finally presented a low angiogenic activity when evaluated by CD34.

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de células da granulosa do ovário (TCGO) correspondem de 1% a 3,3% dos tumores do ovário e a 70% dos tumores derivados do estroma (KALAVATHI, 1971; YOUNG & SCULLY, 1987; LAUSZUS et al., 2001). Ocorrem em mulheres entre 30 a 70 anos, sendo a faixa etária de maior acometimento dos 35 aos 55 anos (SEROV, SCULLY, SOBIN, 1973). Menos de 5% dos casos ocorrem antes da puberdade (EVANS et al., 1980). Considerados tumores de baixo potencial de malignidade, dividem-se em dois grandes grupos que diferem clínica e histologicamente: a forma adulta e a juvenil (EVANS et al., 1980).

A forma adulta corresponde a 95% dos TCGO (YOUNG & SCULLY, 1987; DERCHAIN et al., 1997). Tem uma evolução lenta ,ocorrendo em todas as idades, embora mais freqüente na pós-menopausa (DIDDLE & CONNOR, 1951). Trata-se do tumor produtor de estrogênio mais freqüente. O quadro clínico das pacientes com a variedade adulta, no menacme, é decorrente, na maioria das vezes, do hiperestrogenismo, podendo ocorrer amenorréia, irregularidade menstrual ou sangramento uterino profuso (STENWIG, HAZEKAMP, BEECHAM, 1979; EVANS et al., 1980; MALMSTRÖM et al., 1994). Na pós-

menopausa as pacientes apresentam sangramento em 41% a 48% dos casos, sendo esta a queixa mais freqüente (EVANS et al., 1980; WESTHOLM, 1987; MALMSTRÖM et al., 1994). Anormalidades endometriais associadas, tais como hiperplasia ou adenocarcinoma não são incomuns. O adenocarcinoma, que costuma ser do tipo endometrióide bem diferenciado (grau I), tem sido registrado entre 5% e 25% dos casos, dependendo dos critérios de diferenciação adotados entre hiperplasia atípica e adenocarcinoma endometrióide grau I (STENWIG et al., 1979; MALMSTRÖM, et al., 1994). Outros efeitos estrogênicos podem ser observados como mastodínia ou ingurgitamento das mamas e citologia vaginal com um aumento de maturação das células escamosas (DISAIA & CREASMAN, 1997). Os TCGO, em raras ocasiões, são produtores de androgênios com manifestações tipo hirsutismo, oligomenorréia ou amenorréia, involução das mamas, hipertrofia do clitóris e mudança da voz (NORRIS & TAYLOR, 1969; GUINTOLI et al., 1976; NAKASHIMA, YOUNG, SCULLY, 1984; LAUSZUS et al., 2001). As queixas, quando hormônio não-dependentes, são de dores abdominais, agudas ou não, distensão abdominal, desconforto urinário, disúria e dispareunia (FOX & LANGLEY, 1976; STENWIG et al.,1979; MALMSTRÖM et al., 1994).

A variedade juvenil dos TCGO ocorre em 97% dos casos nas três primeiras décadas de vida, diferindo histologicamente da forma adulta. Em 80% dos casos está associado à puberdade precoce isossexual determinando o desenvolvimento das mamas, pêlos pubianos e axilares além de irregularidade

menstrual. São bilaterais em 2% dos casos e o tamanho médio do tumor excede os 10cm (YOUNG, DICKERSIN, SCULLY, 1984; POWELL et al., 2001).

Tanto na forma adulta quanto na juvenil o diagnóstico se realiza, na maioria das vezes, no estádio I, ocorrendo em 76% a 97% dos casos (STENWIG et al., 1979; BJORKHOLM & SILFVERSWARD, 1981; YOUNG et al., 1984; MALMSTRÖM et al., 1994; LAUSZUS et al., 2001). Ao contrário dos achados destes autores, DERCHAIN et al. (1997) no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) observaram uma alta prevalência de casos com estádio avançado. Cinco em um total de 11 casos apresentaram doença no estádio III.

Os TCGO se associam à sobrevida global de cinco anos em 80% a 90% dos casos e em dez anos de 72% a 80% (STENWIG et al., 1979; MALMSTRÖM et al., 1994; WU, ZHANG, LI, 2000; LAUSZUS et al., 2001) e as recidivas, na maioria das vezes tardias, ocorrem entre 9% a 35% dos casos (MORRIS & SCULLY, 1958; MALMSTRÖM et al., 1994; LAUSZUS et al., 2001).

Macroscopicamente, as formas adulta e juvenil são similares. Os tumores têm superfície bocelada, são sólidos, brancos a amarelados, e mostram freqüentemente hemorragia e degeneração cística central (CARVALHO, 1995). O hemoperitônio costuma ser uma complicação relativamente comum, sendo registrado em até 15% dos casos (DISAIA & CREASMAN, 1997; LEE et al., 1999).

Microscopicamente, a variedade adulta é caracterizada por células pequenas, com citoplasma escasso ou, mais raramente, luteinizado. O núcleo

pode ser redondo ou ovalado, angular ou fusiforme e, em geral, pálido e fendido, com aparência de "grão de café" (OZOLS et al., 1996; BOMPAS et al., 2000). Estas células apresentam-se em arranjos difusos, macro ou microfolicular com corpúsculos de Call-Exner. Os padrões microscópicos podem ser: 1) microfolicular; 2) macrofolicular; 3) trabecular; 4) insular; 5) sólido ou difuso; 6) giriforme ; e 7) formas mistas (BJORKHOLM & SILFVERSWARD, 1981; SCULLY, 1999). A forma difusa é a mais indiferenciada, dificultando o diagnóstico diferencial com os carcinomas indiferenciados, podendo estar acompanhada de células atípicas de padrão sarcomatóide.

Em relação à variedade juvenil, pode-se observar o componente tecomatoso com certa freqüência; as células apresentam citoplasma abundante e freqüentemente luteinizado, com alta contagem mitótica. Os núcleos são hipercromáticos e geralmente não apresentam aspecto de grãos de café. O pleomorfismo pode estar presente e mesmo que estes tumores aparentem ser menos diferenciados que o tipo adulto, têm um alto índice de cura.

O diagnóstico dos TCGO é difícil de ser estabelecido, podendo haver confusão com os tumores carcinóides, carcinomas indiferenciados e adenocarcinomas (DISAIA & CREASMAN, 1997). A dificuldade é ainda maior quando a avaliação é realizada através de biópsia de congelação. Um estudo sobre a acurácia desta modalidade diagnóstica intra-operatória nos tumores ovarianos demonstrou que o pior desempenho ocorreu justamente entre os TCGO (PINTO, ANDRADE, DERCHAIN, 2001). A procura de células em forma de grão de café ou corpúsculos de Call-Exner podem auxiliar neste sentido, mas

na ausência destes elementos alguns marcadores podem ser úteis no diagnóstico diferencial, tais como a vimentina e a inibina, positivas nos TCGO; citoqueratinas e antígeno de membrana epitelial (EMA), positivos nos carcinomas, e enolase neurônio específica (NSE) e cromogranina, positivas nos carcinóides (CARVALHO, 1995; HILDEBRANDT, ROUSE, LONGACRE, 1997; GEBHART, 2000).

A pesquisa de fatores prognósticos tem intuito de desenvolver modelos preditivos que sejam úteis para diferentes propósitos: 1) identificar subgrupos de pacientes que tenham uma pior evolução da neoplasia; 2) determinar critérios de estratificação em ensaios clínicos futuros; 3) melhorar a precisão da comparação de resultados de tratamentos em ensaios clínicos aleatorizados; 4) selecionar grupo-controle não aleatorizado (Byar, 1984).

O estadiamento é o fator prognóstico clínico de maior importância (BJORKHOLM & PETTERSON, 1980; EVANS et al., 1980; BJORKHOLM & SILFVERSWARD, 1981; WU et al., 2000). Tem sido também atribuído algum valor prognóstico a outros parâmetros como idade da paciente (FOX, AGRAWAL, LANGLEY, 1975; STENWIG et al., 1979), tamanho do tumor (FOX et al., 1975; BJÖRKHOLM & PETERSON, 1980; WU et al., 2000), extensão da cirurgia (EVANS, 1980; LAUSZUS et al., 2001), extensão extra-ovariana da doença (FONTANELLI et al., 1998; CRONJÉ, et al., 1999). Os fatores histológicos de caráter prognóstico incluem atipia celular e atividade mitótica (FOX et al., 1975; STENWIG et al., 1979; BJORKHOLM & PETERSON et al., 1980; MALMSTRÖM et al., 1994) (Quadro 1, Anexo 2). Mas, segundo outros autores, nenhuma correlação significativa entre os padrões histológicos e prognóstico foi estabelecida

(DISAIA & CREASMAN, 1997). Esta escassez de fatores prognósticos, em nível clínico e/ou histológico, leva-nos à necessidade de identificação de outros marcadores detectáveis com técnicas de biologia molecular que tenham este papel preditivo da evolução da doença.

A perda da função do gene supressor de tumor p53 é o evento genético mais freqüentemente descrito em cânceres humanos. A proteína produzida pelo tipo selvagem do p53 tem, entre outras funções, a de suspender o ciclo celular e prevenir a proliferação de células com DNA danificado (DARNTON, 1998; MAY & MAY, 1999). Muito além de inibir o processo de proliferação celular, acredita-se que o p53 tenha um papel ativo na prevenção da carcinogênese (DEPASQUALE, GIORDANO, DONNENFELD, 1998; MAY & MAY, 1999). Se o reparo do DNA durante a suspensão do ciclo celular falhar, o tipo selvagem do p53 pode induzir o processo de apoptose ou morte celular programada (VOGELSTEIN & kinzler, 1992; MAY & MAY, 1999). A perda da função do tipo selvagem pode ocorrer por mutação de uma cópia do gene p53 e deleção/inativação do alelo selvagem restante (HOLLSTEIN et al., 1991). A mutação resulta na síntese de uma proteína com conformação, meia-vida e função alteradas. A perda do tipo selvagem do p53 pode levar à instabilidade cromossômica, resultando em aneuploidia com múltiplas amplificações e deleções, como perda de heterozigose (LOH) (DARNTON, 1998). Além de mutações e deleções, a função do p53 pode ser silenciada por produtos virais complexos ou por interações com outros produtos celulares (DARNTON, 1998; MAY & MAY, 1999). Mutações do p53 têm sido encontradas em 15% dos

cânceres ovarianos iniciais (MARKS et al., 1991) e em 50% dos casos avançados (KOHLER et al., 1993; KUPRYJANCZYK et al., 1993; TENERIELLO et al., 1993). Já nos TCGO a expressão do p53 mutante, além de ser muito variável (5% a 72%), tem valor prognóstico discutível já que os trabalhos têm apresentado resultados conflitantes a esse respeito (COSTA et al., 1996; KING et al., 1996; LIU et al., 1996; ALA-FOSSI et al., 1997; WABERSICH et al., 1998; HORNY et al., 1999; GEBHART et al., 2000) (Quadro 2, Anexo 2).

Cada célula normal possui mecanismos complexos responsáveis pela recepção de mensagens estimuladoras do crescimento do microambiente local e pela transmissão das mesmas para o núcleo, onde genes responsáveis pela divisão celular são ativados. Os proto-oncogenes são conhecidos pela codificação de muitos dos componentes destes mecanismos, incluindo fatores de crescimento, mediadores citoplasmáticos de sinal e fatores de transcrição intranuclear. Até o presente momento o proto-oncogene mais estudado nos cânceres de ovário é o c-erbB-2 (GALLION et al., 1995; ELTABBAKH et al., 1997; ROSS & FLETCHER, 1999).

O c-erbB-2 é um gene localizado no cromossomo 17, que codifica a proteína transmembrana p185 que, por sua, vez é um receptor do fator de crescimento tirosina quinase de elevada homologia com o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF - epidermal growth factor) (ROSS et al., 1997). O epitélio ovariano normal e 86% das neoplasias epiteliais malignas do ovário expressam alguma quantidade deste produto p185 (TYSON et al., 1991). A amplificação e/ou expressão aumentada do c-erbB-2 tem sido demonstrada em

10% a 50% dos cânceres de ovário e tem sido associada com mau prognóstico (SLAMON et al., 1989; BERCHUCK et al., 1990; ZHENG et al., 1991; KACINSKI et al., 1992; RUBIN et al., 1994; MEDEN et al., 1998). Já nos TCGO a amplificação e/ou expressão aumentada do c-erbB-2 foi verificada em 31 de uma série de 32 casos, sem relação significante com o prognóstico (KING et al., 1996).

A cinética celular e a taxa de proliferação celular são de importância prognóstica no estudo das neoplasias (VAN DIEST , BRUGAL, BAAK, 1998) . Estes parâmetros têm sido avaliados nos TCGO através da contagem mitótica, atipia nuclear, citometria de fluxo com análise de fração da fase S, mas os resultados têm sido controversos segundo vários autores (FOX et al., 1975; STENWIG et al., 1979; BJORKHOLM & SILFVERSWARD, 1981; HITCHCOCK et al., 1989; HOLLAND et al., 1991; HABA et al., 1993; MALMSTRÖM et al., 1994; WU et al., 2000). A cinética de proliferação celular pode também ser estudada de outras formas, com a utilização de anticorpos monoclonais que se ligam com antígenos específicos de proliferação. Alguns desses anticorpos foram detectados com sucesso por reação imuno-histoquímica (IHQ) IHQ (GERDES et al., 1983; BROWN & GATTER, 1990).

O Ki-67 reage com uma proteína dimérica, não-histônica, de 395 e 345 kDa em células normais e neoplásticas nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular (GERDES et al., 1984; SHOLZEN & GERDES, 2000). O gene que codifica o antígeno Ki-67 localiza-se no cromossomo 10 (10q25). A reatividade ao Ki-67, usualmente expresso em porcentagem de células coradas, tem sido

demonstrada como marcador de mau prognóstico em câncer de mama, câncer cervical e tumores epiteliais malignos e de células da granulosa do ovário (BROWN & GATTER, 1990; ISOLA et al., 1990; DEVICTOR et al.,1993; HENRIKSEN et al., 1994; GARZETTI et al., 1995; KING et al., 1996; COSTA et al., 1996; WABERSICH et al., 1998; HORNY et al., 1999).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma ciclina de 36 kDa com papel crítico na fase inicial da proliferação celular, mas também envolvida no reparo de DNA, na transcrição e regulação do ciclo celular. Atua como cofator das enzimas DNA polimerases δ e ε (KELMAN, 1997), estando presente na fase S e não detectada na fase G0 (BRAVO & CELIS, 1978; BRAV0 & MACDONALD-BRAVO, 1987; GARCIA, COLTRERA GOWN, 1989). Como indicadora de proliferação celular, a expressão do PCNA foi descrita no carcinoma gástrico inicial, em nódulos metastáticos, em carcinoma de ovário, em carcinoma ductal de mama e em recidiva de meningiomas intracranianos (COBB et al., 1996; MAEDA et al., 1996; MINGUILLON et al., 1996; KESARI et al., 1997; REITMAIER et al, 2000). Para a detecção IHQ do PCNA utiliza-se o anticorpo monoclonal anti PCNA, clone PC10 (BRAVO & MACDONALD-BRAVO, 1987; SHIVJI, KENNY, WOOD, 1992). Até o presente momento a expressão deste antígeno, bem como o seu valor prognóstico, não foram estudados nos TCGO.

O crescimento de tumores malignos requer a formação de novos vasos capilares. Tecidos com alta taxa de proliferação necessitam de um adequado suprimento sangüíneo, proporcionado por uma rede vascular. Devido à demanda metabólica dos tumores malignos, espera-se que a sua densidade microvascular

seja mais alta do que em tecidos normais. Acredita-se que a neovascularização esteja diretamente relacionada com o potencial metastático dos tumores (BOSARI et al.,1992; WEIDNER et al., 1992; HORAK et al., 1992; GASPARINI et al., 1994; OBERMAIR et al., 1995). Conseqüentemente, a quantificação e a inibição da angiogênese constituem abordagens prognósticas e terapêuticas promissoras no estudo das neoplasias.

A neovascularização e sua influência na sobrevida tem sido estudada em carcinomas de mama, pulmão, próstata, cólon, endométrio e colo uterino (FOX et al., 1995; TAKEBAYASHI et al., 1996; MORGAN, WILKINSON, BUCKLEY, 1996; BRAWER, 1996; PAGE & JENSEN, 1995; COSTELO et al., 1995; GOULDING et al., 1995; MILIARAS, KAMAS, KALEKOU, 1995; KIRSCHNER et al., 1996; DINH et al., 1996; GUIDI et al., 1996). Uma ampla gama de opções para a sua quantificação tem sido descrita até o momento: medidas semiquantitativas do número e áreas com neovasos imuno-histoquimicamente marcados, expressão molecular de citocinas angiogênicas como o fator de crescimento vásculo endotelial (VEGF) e de seu receptor (BOOCOCK et al., 1995), medidas plasmáticas de citocinas circulantes ou expressão funcional / molecular de proteínas envolvidas na neoformação vascular, como as enzimas degradantes de matriz extracelular.

Atualmente, três anticorpos monoclonais voltados contra antígenos de células endoteliais são utilizados com mais freqüência para a marcação IHQ de vasos sangüíneos tumorais: anti-antígeno do fator VIII (BURGDORF, MUKAI, ROSAI, 1981), anti-CD31 (PARUMS et al, 1990) e anti-CD34 (RAMANI, BRADLEY, FLETCHER, 1990). O antígeno CD34 é codificado por um gene localizado no

braço longo do cromossomo 1, tem o tamanho de 110 kDa aproximadamente. Acredita-se que esteja envolvido na adesão leucocitária e migração celular endotelial, durante a angiogênese (FINA et al, 1990). O significado prognóstico da densidade microvascular tumoral nos TCGO, quantificado por IHQ, através do anticorpo anti-CD34, ainda é desconhecido.

Torna-se pertinente investigar se a expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, PCNA, Ki-67 e CD34 estaria correlacionada com as variáveis tamanho do tumor, atipia celular, atividade mitótica, padrão histológico e extensão extra-ovariana da doença em TCGO.

Os TCGO são considerados neoplasias de baixo potencial de malignidade sendo a grande maioria diagnosticada em estádios iniciais. Porém, havia uma suspeita de que a casuística do CAISM/UNICAMP apresentasse uma proporção elevada de TCGO com estádio avançado (DERCHAIN et al., 1997). A avaliação imuno-histoquímica dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34 teve o intuito de caracterizar os casos avançados em comparação com aqueles em estádio inicial, permitindo a melhor compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes a este aspecto particular da casuística do serviço em questão. Além do que, a expressão individual de cada marcador biológico e, principalmente, as correlações mais freqüentes entre eles ainda não estão claramente definidas em mulheres com TCGO, segundo a literatura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a concordância interobservador no diagnóstico histológico e a expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34 segundo características clínico-cirúrgicas e histológicas em tumores de células da granulosa do ovário.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar o coeficiente de concordância interobservador no resultado histológico da revisão da lâmina.

2. Descrever a casuística de TCGO segundo a expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34.

3. .Investigar a possível correlação entre tamanho dos tumores, extensão extra-ovariana, atividade mitótica e padrão histológico com a expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34.

4. Investigar a possível correlação entre os diversos marcadores.

3.Sujeitos e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, descritivo e comparativo.

3.2. Seleção dos sujeitos

3.2.1. Critérios de inclusão

Com o intuito de minimizar os vieses da confirmação diagnóstica, as lâminas dos casos de TCGO foram misturadas com lâminas de tumor carcinóide (um caso) e de carcinomas indiferenciados (três casos). Foram incluídos todos os 22 casos diagnosticados como TCGO e atendidos no CAISM de janeiro de 1988 a fevereiro de 2000. Todas as lâminas foram obtidas do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP. Os números de identificação das lâminas foram recobertos com etiqueta branca. Procedeu-se à avaliação deste novo conjunto de casos sucessivamente pelos patologistas A, B e C, que não tiveram conhecimento do diagnóstico inicial. Ou

seja, a mesma lâmina de cada caso foi revista pelos patologistas envolvidos no estudo, individualmente. Foi realizada análise IHQ com inibina nos casos em que um dos patologistas discordou do diagnóstico de TCGO. O diagnóstico final de TCGO foi estabelecido quando houve:

1. concordância dos três patologistas; ou

2. concordância de dois, porém reação de inibina positiva (diagrama 1, Anexo 2).

3.2.2. Critérios de Exclusão

- Casos no quais dois patologistas tenham discordado do diagnóstico inicial de TCGO;
- Casos no quais um patologista tenha discordado do diagnóstico inicial de TCGO, e que a reação IHQ para inibina tenha sido negativa;
- Amostras que apresentaram fixação inadequada para os ensaios propostos.

3.3. Definição de variáveis

A seguir, estão listadas as variáveis utilizadas no estudo com suas respectivas categorias.

- *Tamanho do tumor*: Maior diâmetro do tumor medido em centímetros, especificado no laudo de exame anatomopatológico. $\leq$ 10cm, > 10cm.
- *Extensão extra-ovariana da doença:* Limites da disseminação do tumor estabelecidos com os achados da laparotomia. Sim e não.

- *Padrão histológico*: Classificação histológica do tumor segundo critérios morfológicos por SCULLY (1999). Padrão folicular e/ou clindromatoso; padrão sólido/difuso e sarcomatóide.

- *Atipia celular*: Classificação do tumor conforme o grau de pleomorfismo nuclear e celular: ausente, pouca atipia (+1), atipia moderada (+2) e atipia severa (+3).

- *Atividade mitótica*: Classificação do tumor segundo a quantidade de mitoses detectadas em 10 campos de maior aumento (CMA) com microscópio óptico. $\leq$2 mitoses e >2 mitoses (STEMWIG, et al., 1979; VAN DIEST et al., 1998).

- *p53*: gene supressor de tumor que desempenha um papel na proliferação e diferenciação celulares. Pode existir na forma selvagem ou mutante e esta última será detectada por método imuno-histoquímico. Denonima-se positivo se >10% dos núcleos corados e negativo se $\leq$10% dos núcleos corados (KOHLER et al., 1996; KUPRYJANCZYK et al., 1994).

- *c-erbB-2*: proto-oncogene localizado no cromossomo 17, codifica um mRNA de 4.6kb, traduzido em uma proteína transmembrana de 185kDa, que, por sua vez, é um receptor de fator de crescimento tirosina-quinase de elevada homologia ao receptor do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor* - EGF). Positivo e negativo (ELTABBAKH et al., 1997).

- *Ki-67*: Anticorpo monoclonal que reage com um antígeno nuclear desconhecido em células normais e neoplásicas nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. É considerado marcador de proliferação. Negativo, positivo $\leq$20% e positivo >20% (GARZETTI et al.,1995).

- *PCNA*: Antígeno nuclear de proliferação celular ou de estrutura polipeptídica e não histônico, que é expresso durante a divisão celular. Existe uma correlação entre o nível de sua expressão e a atividade proliferativa da célula. Negativo, baixo índice de proliferação (BIP) se $\leq$50% dos núcleos corados e alto índice de proliferação (AIP) se >50% dos núcleos corados (TEIXEIRA, 1993).

- *CD34*: anticorpo monoclonal voltado contra uma glicoproteína de membrana de ~110 kDa localizada em células endoteliais. Serve para a marcação IHQ de vasos e, conseqüentemente, para a medida da atividade angiogênica. Alta atividade angiogênica (AAA) e baixa atividade angiogênica (BAA).

Obs. Para maiores detalhes a respeito dos critérios para categorização das variáveis IHQs ver item 4.5.3 Avaliação das colorações.

3.4. Métodos

3.4.1. Processamento do material

O material sob estudo foi proveniente de 22 tumores fixados em formaldeído e arquivados em blocos de parafina no Departamento de Anatomia Patológica / FCM / UNICAMP. Os blocos selecionados, com diagnóstico de TCGO, definido segundo os critérios de inclusão e exclusão, foram submetidos a 10 cortes seriados de 5µm e montados em lâminas (numeradas de 1 a 10) para as reações IHQs (duas lâminas para cada um dos marcadores).

3.4.2. IHQ

As secções foram desparafinadas em banho de xilol a 110°C e, a seguir, banhos subseqüentes em xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de H_2O_2 a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS (solução salina tamponada com fosfatos) (pH 7,4 a 7,6). Para recuperação antigênica foi utilizada uma panela a vapor T-fall, com o objetivo de desmascarar os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0 durante 30 minutos a 95°C e, a seguir lavadas em água corrente. Após a recuperação do antígeno, o anticorpo primário foi incubado *overnight* a 4°C. Após a incubação as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com o *EnVision Labeled Polymer component* por uma hora a 37°C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS sob agitação. Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico, a solução DAB (3-3'-Diaminobenzidina), na proporção de 0,06g para 100ml de PBS e 500µl de H_2O_2 a 20 volumes e 1ml de DMSO, por cinco minutos a 37°C. O material foi lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. As lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, e diafanizadas em três banhos de xilol, para a seguir serem montadas com lamínulas e resina Entellan®.

As secções correspondentes sem o anticorpo primário foram utilizadas como controles negativos. Os diferentes anticorpos, suas diluições e seus respectivos controles positivos estão resumidos no Quadro 4 (Anexo 2).

3.4.3. Avaliação das colorações

Todas as lâminas foram avaliadas com microscópio óptico (diâmetro de campo 490 μm) e a fração de células cancerosas positivas foi definida como a porcentagem de toda área tumoral. Os dados clínicos das pacientes no que se refere às suas evoluções foram mascarados perante os observadores. A colorações foram avaliadas por dois patologistas independentes (A e D). Os casos em que houve discordância entre os observadores foram submetidos a uma nova análise em conjunto.

- ***p53*:** Apenas a coloração nuclear das células tumorais foi considerada positiva. Para correlações posteriores com dados clínicos e com as outras variáveis, a coloração para o p53 seria categorizada em: 1) positiva quando >10% dos núcleos fossem positivos e, 2) negativa se $\leq$10% dos mesmos fossem positivos (KOHLER et al., 1996; KUPRYJANCZYK et al., 1994).

- ***c-erbB-2*:** Foi considerada marcação positiva para c-erbB-2 somente quando os grânulos de coloração marrom estivessem presentes na membrana celular, sendo que a coloração citoplasmática foi considerada não específica. Após o cálculo da porcentagem de células positivas de um total de 200, a categorização foi feita segundo o seguinte critério: +1 (menos de 25% de células positivas), +2 (25% a 50% de células

positivas), +3 (50% a 75% de células positivas) e +4 (mais que 75% de células positivas) (ELTABBAKH et al., 1997).

- ***Ki-67*****:** Foi calculada a porcentagem de núcleos imunorreativos através d a análise de um total de 200. A positividade nuclear para o Ki-67 foi classificada em dois grupos: baixo índice de proliferação se $\leq$ 20% das células tumorais fossem Ki-67 positivos, e de alto índice de proliferação se > 20% das células fossem positivas, de acordo com GARZETTI et al. (1995).

- ***PCNA*****:** A expressão deste marcador foi considerada positiva quando o núcleo da célula apresentou coloração acastanhada, e negativa, na sua ausência ou em casos de núcleos fracamente corados. Foram contadas as células imunorreativas para este marcador em um grupo total de 200 e calculada a sua porcentagem. Tumores que expressaram $\leq$50% das células positivas para o marcador foram considerados de baixo índice de proliferação. Caso contrário, foram classificados como de alto índice de proliferação (TEIXEIRA, 1993).

- ***CD34*****:** Foi realizado um rastreamento de todo corte em pequeno aumento para localização de uma área de maior concentração de microvasos. A partir desta área foram contados vasos em três campos adjacentes de grande aumento de 400 X (o que corresponde a cerca de 0,64mm^2 no microscópio óptico usado). Se a média do número de microvasos nos três campos adjacentes (densidade microvascular) foi um valor $\leq$ 100/mm^2, o tumor foi considerado de baixa atividade angiogênica. Se o valor for > 100/mm^2 o tumor foi considerado de alta atividade angiogênica (MARTIN et al., 1997).

3.5. Instrumento para coleta dos dados

Os dados foram coletados através de uma ficha codificada e pré-testada (Anexo I). Os dados referentes aos itens 3.6 ao 3.18, embora não relacionados com os objetivos do estudo em si, foram coletados dos prontuários médicos das pacientes para descrição clínica da casuística de TCGO do CAISM/UNICAMP.

3.6. Processamento e análise dos dados

Os dados das fichas codificadas foram revistos manualmente para correção do preenchimento e, a seguir, inseridos em um banco de dados montado com a utilização do programa *Excel (Microsoft- Office* 2000). O processo de digitação foi realizado duas vezes pelo pesquisador principal e os dados que apresentaram discordância foram revistos nas fichas codificadas para, em seguida, serem corrigidas. Em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa *SAS* versão 6.12. (*SAS Institute Inc.*; *Cary, NC*). A análise univariada de associação entre as variáveis categóricas foi realizada com o teste exato de Fisher (FISHER & VAN BELLE, 1993), e entre as variáveis categóricas e contínuas, com teste de Mann-Whitney. Para comparar a análise dos observadores foram realizados os testes de pares concordantes e discordantes para avaliar o coeficiente *kappa (*LANDIS & KOCH, 1977). A qualificação da concordância está descrita no Quadro 3, Anexo 2.

3.7. Aspectos éticos

Foram respeitados os princípios enunciados na *Declaração de He*lsinque (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 1996), mantendo-se em sigilo a identidade das pacientes, cujos dados foram identificados apenas pelo número de registro no projeto.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM - UNICAMP. A princípio, as análises realizadas neste estudo não implicaram em quaisquer modificações no tratamento da doença e em momento algum foram introduzidas coletas adicionais. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos às pacientes, pois toda a pesquisa foi realizada em material biológico que necessariamente tinha sido retirado como parte do tratamento. Por ser um estudo retrospectivo e não havendo risco, foi considerada a assinatura de um termo de consentimento não aplicável a este projeto. Entretanto, se tivesse ocorrido alguma descoberta que pudesse modificar positivamente o tratamento e acompanhamento das pacientes, estas poderiam ter sido localizadas e informadas a respeito nos casos em que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM tivesse julgado procedentes.

4. Resultados

Dos 22 casos resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, 21 tiveram seus diagnósticos de tumor de células da granulosa do ovário confirmados pelos patologistas envolvidos no estudo. O diagnóstico da paciente n^0 2 foi reconsiderado como carcinoma indiferenciado, tumor carcinóide e carcinoma endometrióide, respectivamente pelos patologistas A, B e C (Figura 1, Anexo 2). O diagnóstico de TCGO foi firmado mesmo na ausência de unanimidade entre os patologistas em quatro casos (números 15, 23, 25 e 26) devido à reatividade para a inibina (Tabela 1; Figuras 2, 3 e 4 do Anexo 2).

TABELA 1

REAVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS TCGO E EXPRESSÃO DE INIBINA NOS CASOS EM QUE PELO MENOS 1 PATOLOGISTA DISCORDOU DO DIAGNÓSTICO

Caso	Diagnóstico inicial	Patologista			Inibina
		A	B	C	
1	TCGO	TCGO juvenil	TCGO juvenil	TCGO	NR
2	TCGO	CI	TCA	CE	NR
3	TCGO	TCGO	TCGO juvenil	TCGO	NR
4	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
5	TCGO	Teca-granulosa	TCGO	TCGO	NR
6	TCA	TCA	TCGO	CE?	NR
7	Metástase em linfonodo	metástase de CI (Neuroendócrino?)	TCGO	TCGO ou CI de pequenas células	negativo
8	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
9	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
10	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
11	CI	CI	TCGO	CE?	NR
12	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
13	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
14	CI	CI	CI	CI	NR
15	TCGO	TCGO	TCGO	CI	positivo
16	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
17	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
18	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
19	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
20	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
21	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
22	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
23	TCGO	Teca-granulosa	CI	TCGO	positivo
24	TCGO	TCGO	TCGO	TCGO	NR
25	TCGO	TCGO	TCGO	CI	positivo*
26	TCGO	TCGO	TCGO	CI	positivo

TCGO: tumor de células da granulosa do ovário; CI: carcinoma indiferenciado; CE: carcinoma endometrióide; TCA: tumor carcinóide; NR: não realizado; * focal apenas, provavelmente por problema de fixação

Os coeficientes *kappa*, para a avaliação da taxa de concordância entre os patologistas A/B foram de 0,42 (IC95%: -0.05 a 0.88); A/C, 0,50 (IC95%: 0,13 a 0,86); e B/C, 0,24 (IC95%: -0,14 a 0,61) (Tabelas 2a, 2b e 2c). Três pacientes foram excluídas devido a não localização dos seus respectivos blocos de parafina para as reações IHQs e/ou não disponibilidade de dados clínicos completos.

TABELA 2a

CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADORES (A x B) NO DIAGNÓSTICO DE TCGO, COEFICIENTE KAPPA E SEU RESPECTIVO INTERVALO DE CONFIANÇA

Patologista A	Patologista B		Total
	TCGO	Outro tumor	
TCGO	20	1	**21**
Outro tumor	3	2	**5**
Total	**23**	**3**	**26**

Coeficiente *kappa*: 0,42 IC95% (-0,05 a 0,88)

TABELA 2b

CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADORES (A x C) NO DIAGNÓSTICO DE TCGO, COEFICIENTE *KAPPA* E SEU RESPECTIVO INTERVALO DE CONFIANÇA

Patologista A	Patologista C		Total
	TCGO	Outro tumor	
TCGO	17	4	**21**
Outro tumor	1	4	**5**
Total	**18**	**8**	**26**

Coeficiente *kappa*: 0,50 IC95% (0,13 a 0,86)

TABELA 2c

CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADORES (B x C) NO DIAGNÓSTICO DE TCGO, COEFICIENTE *KAPPA* E SEU RESPECTIVO INTERVALO DE CONFIANÇA

Patologista C	Patologista B		Total
	TCGO	Outro tumor	
TCGO	17	1	**18**
Outro tumor	6	2	**8**
Total	**23**	**3**	**26**

Coeficiente *kappa*: 0,24 IC95% (-0,14 a 0,61)

Na Tabela 3 pode-se observar as características clínico-cirúrgicas e histológicas dos casos avaliados e sua correlação com a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos. O tamanho médio do tumor foi de 13cm (mínimo: 4cm e máximo: 30cm) sendo que nove tumores (50%) tinham diâmetro >10cm. Treze (72%) pacientes apresentaram algum componente sólido difuso/sarcomatóide. Doze (66%) pacientes apresentaram tumor sem ou com atipia celular leve e seis (33%) pacientes, tumores com atipia moderada/intensa. Quatorze (78%) pacientes apresentaram tumor com contagem mitótica $\leq$ 2/ 10 CMA.

Seis (33%) pacientes apresentaram extensão extra-ovariana da doença e a proporção de casos avançados foi de 33% (IC95%: 11,4% a 53,5%).

Apenas uma paciente apresentou expressão positiva para o p53 mutante (Figura 5, Anexo 2). Por outro lado, nenhuma paciente apresentou expressão aumentada do c-erbB-2. Onze (61%) casos apresentaram imunopositividade para o Ki-67, porém nenhum deles foi considerado de alto índice de proliferação segundo o ponto de corte de 20% (Figura 6, Anexo 2). Todas as pacientes apresentaram positividade para PCNA sendo que 14 (78%) foram classificadas como sendo de alto índice de proliferação, segundo o ponto de corte de 50% (Tabela 3; Figura 7 do Anexo 2).

TABELA 3

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E IHQS DAS PACIENTES COM TUMOR DE CÉLULAS DA GRANULOSA DO OVÁRIO

Caso	Características clínico-cirúrgicos			Características histológicas			Características imuno-histoquímicas					Seguimento	
	Tamanho do tumor	Extensão extraovariana	Estádio	Componente Sólido difuso	Atipia	Mitose/ 10 CMA	p53	c-erbB-2	PCNA	Ki-67*	CD34**	Estado da paciente no final do seg.	Tempo (meses)
1	>10cm	não	Ic	sim	1	>2	neg	neg	>50%	neg	47,4	VSD	84,4
4	>10cm	não	I	sim	1	≤2	neg	neg	≤50%	neg	33,9	VSD	77,3
8	≤10cm	sim	IIIc	sim	1	≤2	neg	neg	>50%	pos	45,3	VCD	71,6
9	≤10cm	não	Ia	sim	2	≤2	neg	neg	>50%	pos	41,2	VSD/PS	7,7
10	≤10cm	não	Ia	não	1	≤2	neg	neg	≤50%	pos	29,2	VSD	0,7
13	>10cm	não	Ia	sim	1	≤2	neg	neg	>50%	neg	30,7	MORTE	38,8
15	>10cm	não	Ia	sim	2	>2	pos	neg	>50%	pos	50	MORTE	27,6
16	≤10cm	sim	IIIc	sim	1	≤2	neg	neg	>50%	pos	16,2	VSD	71,8
17	>10cm	não	Ia	sim	1	≤2	neg	neg	≤50%	pos	27,6	VSD	21,9
18	>10cm	não	Ic	sim	1	>2	neg	neg	>50%	pos	47,4	VSD	89,2
19	>10cm	sim	IIIb	não	2	≤2	neg	neg	>50%	neg	28,1	VCD	128,8
20	≤10cm	não	Ia	sim	1	≤2	neg	neg	>50%	pos	29,2	VSD	12,9
21	>10cm	sim	IV	sim	1	≤2	neg	neg	>50%	neg	36,5	VSD	29,0
22	≤10cm	não	Ia	não	1	≤2	neg	neg	>50%	neg	20,8	VSD	12,7
23	≤10cm	não	Ia	sim	2	≤2	neg	neg	>50%	neg	0	VSD	11,6
24	>10cm	não	Ia	não	1	≤2	neg	neg	≤50%	pos	12,5	VSD	54,7
25	≤10cm	sim	IIIc	sim	2	>2	neg	neg	>50%	pos	17,2	VSD	5,6
26	≤10cm	sim	IIIc	não	2	≤2	neg	neg	>50%	pos	8,3	VCD	69,0

VSC: viva sem doença; VCD; viva com doença; CMA: campo de maior aumento; PS: perda de seguimento; Seg. seguimento; * todos os casos foram classificados como sendo de baixo índice de proliferação por reatividade apenas focal.** todos os casos foram classificados como sendo de Baixa atividade angiogênica

Apenas a expressão do Ki-67, PCNA e a densidade microvascular mensurada pelo CD34 apresentaram resultados em níveis adequados para avaliar alguma correlação com as outras variáveis.

Não houve correlação estatisticamente significante entre o índice de proliferação dos tumores, medido através da expressão do PCNA ou expressão do Ki-67, e as variáveis tamanho do tumor, extensão extra-ovariana da doença, atividade mitótica, atipia celular e padrão histológico (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA EXPRESSÃO DO PCNA SEGUNDO AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DAS PACIENTES

Característica Clínico-histológica	Categorias	PCNA		p valor*
		BIP	AIP	
Tamanho do tumor (cm)	>10	3	6	0,26
	≤10	1	8	
Extensão extra-ovariana da doença	Sim	0	6	0,11
	Não	4	8	
Padrão histológico	Sólido-difuso/sarcomatóide	2	11	0,26
	Folicular e/ou clindromatoso	2	3	
Atipia celular	Moderada/intensa	0	6	0,11
	Ausente/pouca	4	8	
Atividade mitótica 10 CMA	>2	0	4	0,23
	≤2	4	10	

*Teste exato de Fisher; BIP: baixo índice de proliferação ou ≤50% das células coradas; AIP: alto índice de proliferação ou >50% das células coradas

TABELA 5

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA EXPRESSÃO DO Ki-67 SEGUNDO AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DAS PACIENTES

Característica Clínico-histológica	Categorias	Ki-67		p valor*
		Negativo	Positivo*	
Tamanho do tumor (cm)	>10	5	4	0,15
	≤10	2	7	
Extensão extra-ovariana da doença	Sim	2	4	0,73
	Não	5	7	
Padrão histológico	Sólido-difuso/sarcomatóide	5	8	0,95
	Folicular e/ou clindromatoso	2	3	
Atipia celular	Moderada/intensa	2	4	0,73
	Ausente/pouca	5	7	
Atividade mitótica 10 CMA	>2	1	3	0,52
	≤2	6	8	

Teste exato de Fisher; * focal

A densidade microvascular média foi de 29,0 (CI95%: 21,8 a 36,1) (Figura 8 do Anexo 2). Não houve correlação estatisticamente significante entre esta variável e as outras como tamanho do tumor, extensão extra-ovariana da

doença, atividade mitótica, atipia celular e padrão histológico, quando foi considerada como variável contínua (Tabela 6).

TABELA 6

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA DENSIDADE MICROVASCULAR MARCADA COM CD34 SEGUNDO AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DAS PACIENTES

Característica Clínico-histológica	Categorias	CD34			p valor*
		Microvasos/mm^2 (mediana)	Min	Max	
Tamanho do tumor (cm)	>10	33,9	12,5	50,0	0,08
	≤10	28,3	0,0	45,3	
Extensão extra-ovariana da doença	Sim	22,7	8,3	45,3	0,35
	Não	30,0	0,0	50,0	
Padrão histológico	Sólido-difuso/sarcomatóide	33,9	0,0	50,0	0,06
	Folicular e/ou clindromatoso	20,8	8,3	29,2	
Atipia celular	Moderada/intensa	30,0	12,5	47,4	0,40
	Ausente/pouca	22,7	0,0	50,0	
Atividade mitótica 10 CMA	>2	47,4	17,2	50,0	0,06
	≤2	28,7	0,0	45,3	

*Teste de Mann-Whitney

Não foi detectada significância estatística na relação entre o índice de proliferação dos tumores, medido pelo PCNA, ou expressão do Ki-67 e a densidade microvascular dos mesmos (Tabelas 7 e 8).

TABELA 7

CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR MEDIDO ATRAVÉS DO PCNA E DENSIDADE MICROVASCULAR

PCNA	CD34		
	Microvasos/mm^2 (Mediana)	min	max
AIP	30,0	0	50,0
BIP	28,4	12,5	33,9

Teste de Mann-Whitney – p **valor: 0,49**;
BIP: baixo índice de proliferação; AIP: alto índice de proliferação

TABELA 8

CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DO Ki-67 E DENSIDADE MICROVASCULAR

Ki-67	CD34		
	Microvasos/mm^2 (Mediana)	min	max
Positivo	29,2	8,3	50,0
Negativo	30,7	0	47,4

Teste de Mann-Whitney – p **valor: 0,93**

5. Discussão

A etapa inicial do estudo consistiu em avaliar a credibilidade diagnóstica nos tumores de células da granulosa através de duas formas: 1) revisão diagnóstica com a participação de três patologistas; 2) realização de reação IHQ com inibina nos casos em que não houve unanimidade no diagnóstico. Assim, uma paciente foi diagnosticada como portadora de outra neoplasia que não o TCGO (caso 2). Em cinco casos (7, 15, 23, 25 e 26), um dos patologistas discordou do diagnóstico de TCGO e a reação imuno-histoquímica para inibina foi positiva em quatro (15, 23, 25 e 26).

Em relação àvariação interobservador no diagnóstico de TCGO, pode-se notar que o coeficiente de concordância foi moderado (0,42; IC95%: -0,05 a 0,88), moderado (0,50; IC95%: 0,13 a 0,86) e suave (0,24; IC95%: -0,14 a 0,61), respectivamente para as duplas de patologistas A/B, A/C e B/C. O maior coeficiente de concordância foi verificado entre a dupla A/C mas este valor não foi significativamente diferente dos calculados para as outras duplas, já que existe uma superposição dos seus respectivos intervalos de confiança. Não podemos dizer que os coeficientes de concordância teriam sido melhores se os

patologistas tivessem tido conhecimento dos dados clínicos a respeito da evolução das pacientes. Os casos foram mascarados em relação a estas informações, no intuito de se minimizar os eventuais vieses da reavaliação, já que existia a sensação de que os nossos tumores apresentavam comportamento mais agressivo (DERCHAIN et al., 1997). Vale a pena ressaltar que o diagnóstico de TCGO, sem a disponibilidade dos dados clínicos, em cerca de um quinto dos casos requer complementação com a pesquisa imuno-histoquímica para um painel de marcadores como a inibina, citoqueratinas, vimentina, cromogranina, NSE, já que os coeficientes de concordância interobservadores foram subótimos, quando o diagnóstico foi realizado apenas com a análise morfológica dos casos com a coloração de H&E.

A inibina, um hormônio peptídico composto de duas subunidades α e β (que por sua vez pode ser βa ou βb) (GURUSINGHE et al.,1995), é secretada pelas células granulosas do ovário. Sua maior função fisiológica é inibir a secreção do hormônio folículo estimulante pela glândula pituitária anterior (YING et al.,1988). Tem sido identificada como reguladora intragonadal crítica da proliferação de células gonadais e como a primeira proteína extracelular com função tumoral supressora em ratos (MATZUK et al., 1992). Também as células da granulosa têm sido identificadas como sítios de coloração para a inibina. HILDEBRANDT et al. (1997) conduziram um estudo onde avaliaram a expressão da subunidade α da inibina em 134 tumores primários e metastáticos do ovário em tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina. Verificou-se que a expressão deste marcador se distribuiu da seguinte forma, conforme o tipo histológico: TCGO -

94%; tumores endometrióides - 17%; tumor de Brenner -11%; outros tumores primários ou carcinomas metastáticos pouco diferenciados - 18%. Concluíram que a inibina, apesar de não permitir a distinção dos TCGO de outros tumores derivados do estroma, é um marcador que auxilia no diagnóstico diferencial de tumores derivados do estroma das neoplasias primárias ou metastáticas não estromais.

O comportamento dos tumores de células da granulosa do ovário, apesar das intensas investigações, continua sendo de difícil previsão. O risco de recidiva não é desprezível e independe de sua evolução lenta. A hipótese de que nossos casos pudessem ser mais agressivos, traduzida por suspeita de haver uma proporção anormalmente alta de casos avançados, não foi confirmada no presente estudo por dois motivos. Primeiramente, tivemos uma taxa de 33% de casos não iniciais, e o seu intervalo de confiança (IC 95: 11,4% - 53,5%) se sobrepõe à variação das taxas descritas pela maioria dos autores (3% a 24%) (STENWIG et al., 1979; BJORKHOLM & SILFVERSWARD, 1981; YOUNG et al., 1984; MALMSTRÖM et al., 1994; LAUSZUS et al., 2001). E, segundo, porque o fato da taxa de sobrevida global em cinco anos ser de 88,9% (Figura 9, Anexo 3) está de acordo com os dados da literatura que variam de 80% a 90% (STENWIG et al., 1979; MALMSTRÖM et al., 1994; WU, ZHANG, LI, 2000; LAUSZUS et al., 2001).

Os vários estudos descritos no Quadro 1 apresentam uma série de limitações nas suas respectivas tentativas de identificação dos fatores prognósticos na medida em que a maioria deles, com exceção de um, se utilizou apenas de análise univariada. A interpretação dos seus resultados, portanto, deve ser

realizada com parcimônia. Apenas o estádio da doença foi demonstrado como de valor prognóstico segundo a maioria dos autores (BJORKHOLM & PETERSON, 1980; EVANS et al., 1980; BJORKHOLM & SILFVERSWARD, 1981; WU et al., 2000). Este estudo não visou a detecção de fatores prognósticos dentre os marcadores estudados, por limitações impostas pelo tamanho amostral e tempo curto de seguimento das pacientes. Ou seja, a análise de sobrevida através do método de Kaplan Meier ou de tabelas de vida e a aplicação do teste Log-rank teriam sido inviabilizadas pelo número insuficiente de eventos, sejam eles morte pela doença ou recidiva pós-tratamento. Foi este o motivo pelo qual centramos a investigação na correlação dos marcadores biológicos com os fatores clínico-cirúrgicos e histológicos.

Apenas uma paciente (5%) apresentou expressão positiva para o p53 mutante (número 15). Como já foi assinalado no início, existe uma variação muito grande nas taxas de imunopositividade para este marcador, segundo os vários autores da literatura (5%-72%) (Quadro 2, Anexo 2). Além do problema relacionado com os tamanhos amostrais reduzidos, tal amplitude na variação pode ser explicada pela limitação da IHQ na detecção do p53 mutante, tendo sido este o método utilizado pela grande maioria dos estudos em questão. Investigações recentes têm demonstrado que outras mutações que não sejam *missense*, - como as deleções, adições, ou mutações *splice site* - não levam à produção de uma proteína estável passível de detecção IHQ. Em tumores epiteliais malignos do ovário, por exemplo, este fato pode ser traduzido por uma taxa de falso-negativo de até 30% na imunodetecção do p53 mutante se

levarmos em consideração o seqüenciamento do gene com PCR-SSCP (*polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism*) como padrão-ouro (CASEY et al., 1996; SJORGREN et al., 1996). Assim, temos que ter cautela na interpretação da baixa taxa de positividade da forma mutante do p53 encontrada neste estudo se levarmos em consideração as limitações do método de detecção, mesmo que este achado concorde com os dados da literatura.

Nenhum caso apresentou expressão aumentada para o c-erbB-2, achado que contrasta com os resultados do único estudo onde o comportamento deste oncogene foi avaliado em TCGO. KING et al. (1996) verificaram expressão aumentada para o c-erbB-2 em 97% de sua série de 40 pacientes com este tumor. Aqui também é importante frisar as desvantagens que o método IHQ enfrenta na avaliação da expressão aumentada do c-erbB-2: A primeira delas é a grande variabilidade na sensibilidade descrita para os vários anticorpos anti-c-erbB-2. Segundo PRESS et al. (1994), estes valores oscilam entre 6% a 82% (Quadro 5, Anexo 2). A segunda é a perda da sensibilidade decorrente das alterações antigênicas causadas pelos procedimentos de fixação (PENAULT-LLORCA, ADELAIDE, HOUVENAEGHEL, 1994). Um método alternativo que contorne estas limitações seria a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Estudos de avaliação do desempenho deste método na detecção da superexpressão do c-erbB-2 demonstraram a superioridade deste em relação a IHQ, tanto em especificidade quanto em sensibilidade, quando aplicado em tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina. Este dado foi confirmado pela análise de Northern e Western blot (PAULETTI et al., 1996; PRESS et al., 1997; ROSS & FLETCHER, 1999).

A ausência da expressão IHQ dos marcadores p53 e c-erbB-2 em praticamente todos os casos, tornou desnecessária a correlação dos mesmos com fatores clínicos e histológicos, como havia sido inicialmente proposto enquanto objetivo do estudo.

Além dos problemas específicos de cada marcador e seu respectivo anticorpo, muitos outros fatores de ordem técnica e geral, inerentes ao método IHQ podem ter influenciado os resultados, de forma confundidora. Claramente, a validade da IHQ depende basicamente da qualidade das colorações. Além da qualidade dos anticorpos, outros fatores têm maior impacto nas mesmas, dentre os quais citamos aqueles relacionados com a fixação e processamento do tecido.

Entre os vários fixadores disponíveis, o formaldeído é o mais popular; em grande parte pelo seu baixo custo, facilidade de preparação e pela sua capacidade de preservação de detalhes morfológicos com produção de poucos artefatos. No entanto, a fixação com o formaldeído resulta em perda da imunorreatividade, seja mascarando ou destruindo alguns sítios de ligação do anticorpo (WERNER et al., 2000).

A alteração molecular mais importante induzida pelo formaldeído é a formação de ligações cruzadas entre proteínas ou entre proteínas e ácidos nucléicos, envolvendo pontes de hidroximetileno. Um agravante adicional seria a formação de ligações coordenadas com íons de cálcio. As proteínas fixadas mantêm sua estrutura secundária presente antes da fixação. No entanto, ligações cruzadas

e coordenadas são responsáveis pelo mascaramento dos epítopos pela alteração da estrutura tridimensional das proteínas (WERNER et al., 2000).

Outros fatores dependentes da fixação que possam ter influenciado na qualidade das colorações IHQ, são aqueles que dizem respeito ao momento e tempo de fixação. Um atraso na fixação do material induz a proteólise e, dependendo do antígeno, pode levar à fixação irreversivelmente fraca ou ausente. Além do mais, a proteólise pode levar a ligações não específicas com moléculas não relacionadas (WERNER et al., 2000).

Quando o tempo de fixação com o formaldeído é curto (<24 horas), leva a uma mistura de fixação com formaldeído e álcool. Desta forma, a interrupção da fixação pelo formaldeído antes que a mesma esteja completa levará a ligações cruzadas só na periferia do bloco de tecido. No centro a coagulação induzida pelo álcool durante o processo de desidratação ocorrerá e esta região permanecerá crua e não fixada. Por outro lado, quando o tempo de fixação é prolongado, pode ocorrer diminuição da imunorreatividade por excesso de ligações cruzadas, bem como pela presença de substâncias contaminantes no fixador (WERNER et al., 2000).

Além da fixação, a temperatura de conservação dos blocos de parafina em nossos arquivos, geralmente alta durante grandes períodos do ano, também pode influenciar na perda antigênica (GRABAU et al., 1998).

Não foi objetivo deste estudo analisar o desempenho da IHQ na detecção de marcadores tumorais, em comparação com outros métodos disponíveis, mas

é pertinente tecermos alguns comentários a respeito de seus pontos positivos e negativos. A IHQ é, sem dúvida, um bom método para rastreamento de mutações genéticas e avaliação de proliferação vascular, e tem a vantagem sobre os métodos de análise molecular como o *Southern, Northern e Western blot* ou PCR, que sofrem de problemas decorrentes da mistura de populações celulares alteradas e sãs dentro do tecido, fato esse decorrente do próprio processamento do material (PAULETTI et al., 2000). A IHQ, por outro lado, permite a detecção de alterações ao nível de uma única célula e a sua realização não requer a destruição da arquitetura tissular que, por sua vez, pode ser fonte de valiosas informações (INOUE et al., 1994). A facilidade de sua execução e relativo baixo custo a tornam um método mais adaptável para o uso clínico rotineiro. Mas como já foi visto, as suas limitações em termos de especificidade e sensibilidade não são desprezíveis e, portanto, a garantia da sua qualidade exige, entre outros quesitos, uma equipe bem treinada, uma boa estrutura laboratorial, correta indicação de casos para o exame, em um adequado contexto clínico-morfológico, a seleção de anticorpos para compor o painel diagnóstico, o protocolo bem definido das reações e o desenvolvimento de critérios acurados e padronizáveis de interpretação pelo patologista (BRACHNER, 1989; HOWANITZ, 1990).

Onze (61%) casos apresentaram imunopositividade apenas focal para o Ki-67, e, portanto, foram classificados como de baixo índice de proliferação segundo o ponto de corte de 20%. Este achado está de acordo com o estudo de HORNY et al.(1999) onde foi verificado que, numa série de 11 casos de TCGO, todos apresentavam índice de proliferação muito baixo, tendo 10%

como ponto de corte. No entanto, KING et al. (1996) realizaram um estudo onde se notou além de uma taxa de 69% de imunopositividade para o Ki-67, uma correlação negativa estatisticamente significante deste fator com a sobrevida.

Houve uma discordância muito significativa em relação ao índice de proliferação dos tumores conforme estes tenham sido avaliados pelo Ki-67 ou PCNA. O primeiro marcador revelou tumores, como já vimos, pouco proliferantes, ao passo que o segundo revelou justamente o contrário.

Vários motivos podem ter levado a este resultado. O PCNA é um marcador de proliferação celular que está sujeito a inúmeras inconsistências biológicas e técnicas. Sua expressão é influenciada pelo tipo de fixador, de modo que, quando utilizado em materiais preparados com formalina, acaba marcando células praticamente em todas as fases do ciclo celular (padrão nucleoplasmático, usualmente intenso). Alguns aspectos biológicos complicam ainda mais a interpretação de reações para o PCNA - há superexpressão em alguns tipos de tumores malignos, não relacionada às fases do ciclo celular, células normais adjacentes a neoplasias e fora do ciclo celular, podem também apresentar expressão do antígeno (HALL. et al., 1990). Um outro fator bem conhecido é a sua meia-vida muito longa - cerca de 20 horas, o que leva muitas células a persistirem apresentando o antígeno, mesmo que tenham deixado o ciclo celular (SCOTT et al., 1991). Isto, por sua vez, resulta na proporção de positividade IHQ maior do que a esperada quando avaliamos outros marcadores de proliferação celular. Uma vantagem do Ki-67, por outro lado, é a sua meia-vida curta, com o antígeno sendo degradado uma hora ou menos após a mitose

(BRUNO & DARZYNKIEWICZ, 1992). Isso garante que células que já tenham saído do ciclo celular não apresentem o antígeno. O fato de as células em fase G1 precoce, que acabaram de sair de G0, não apresentarem o antígeno faz com que freqüentemente se argumente que a marcação do Ki-67 levaria a alguma subestimação da fração de crescimento de um tecido; outros, no entanto, têm demonstrado justamente o contrário (SCOTT et al.,1991).

De qualquer forma, somos muito mais propensos a levar em consideração os dados produzidos pela avaliação com o Ki-67 em detrimento daqueles resultantes da avaliação com o PCNA. Em outras palavras, classificar os TCGO como pouco proliferantes é muito mais compatível com o seu comportamento biológico indolente, de modo que devemos interpretar cuidadosamente as informações contidas nas Tabelas 4 e 7, onde foram realizados cruzamentos de informações obtidos pelo PCNA com variáveis clínicas, histológicas e com a densidade microvascular dos tumores.

A capacidade angiogênica dos TCGO é um tema ainda não explorado até o presente momento. Três aspectos devem ser ressaltados na análise do nosso resultado: 1) o tipo do anticorpo; 2) a sua diluição; e 3) padronização do critério de leitura. No que diz respeito ao anticorpo, como vimos na introdução, três tipos têm sido utilizados com maior freqüência na avaliação da angiogênese nos processos malignos: o anti-CD31, anti-CD34 e o antifator VIII. No presente estudo, a escolha recaiu sobre o segundo devido ao fato deste ser mais específico, em comparação com os outros dois. MARTIN et al. (1997), avaliaram o desempenho destes três anticorpos na análise da atividade angiogênica de

carcinomas ductais mamários. Foi observado que o anticorpo anti-CD34 (Q BEND/10), em concentração ótima (1:100), não corou células inflamatórias ou tecido conjuntivo, foi responsável por pouca coloração de fundo e, portanto, apresentou maior facilidade na contagem dos vasos tumorais. Ainda não sabemos qual deve ser a diluição ótima do anticorpo anti-CD34 para os TCGO. Em todo caso, utilizamos no presente estudo a concentração de 1:25, seguindo os protocolos de avaliação de diferentes diluições padronizadas no nosso laboratório, associados às indicações dos fabricantes e à qualidade de coloração dos controles. No que se refere ao critério de leitura, utilizamos aquele estabelecido também por MARTIN et al. (1997). O ponto de corte de 100 microvasos/mm^2 é resultado de uma análise que envolveu uma casuística composta por carcinomas mamários, sabidamente mais agressivos que o TCGO e com maior capacidade de disseminação hematogênica. Portanto, um estudo IHQ da capacidade angiogênica dos TCGO deverá objetivar a definição de um marcador ideal, dentre os vários existentes, bem como a sua diluição ótima, além de um critério de leitura específico das colorações, em uma amostra com tamanho e tempo de seguimento adequados.

Enfim, em nossa casuística verificamos que os TCGO são neoplasias de difícil diagnóstico quando avaliados somente através do H&E, tornando recomendável a complementação da análise com reação IHQ para outros marcadores como a inibina. A avaliação IHQ dos marcadores biológicos, levando-se em consideração as limitações do método, mostrou que os TCGO são neoplasias cujo mecanismo de desenvolvimento aparentemente não

envolve mutações do p53 e nem expressão aumentada do c-erbB-2; apresentaram resultados conflitantes no que diz respeito ao índice de proliferação celular conforme foram avaliados pelo Ki-67 ou PCNA; e finalmente, são pouco angiogênicos quando avaliados pelo CD34.

6. Conclusões

1. A taxa de concordância interobservador, no diagnóstico histológico em coloração H&E dos tumores de células da granulosa, entre patologistas experientes, sem o conhecimento dos dados clínicos e macroscópicos da peça foi apenas suave/moderado. O diagnóstico apenas em H&E foi discordante entre os três patologistas em cerca de um quinto dos casos, demonstrando a necessidade de reações imuno-histoquímicas para o diagnóstico diferencial em uma parcela dos TCGO.

2. Apenas uma paciente apresentou expressão positiva para o p53 mutante e nenhuma apresentou expressão aumentada do c-erbB-2. Onze (61%) casos apresentaram imunopositividade para o Ki-67 de baixo índice de proliferação. Todas as pacientes apresentaram positividade para PCNA, sendo que 14 (78%) destas foram classificadas como sendo de alto índice de proliferação.

3. Apenas o Ki-67, PCNA e o CD34 foram expressos em níveis adequados para serem testados quanto à associação com outras variáveis clínico-cirúrgicos e histológicas. Não houve correlação estatisticamente significante entre o índice de proliferação dos tumores (medido pelo PCNA) ou expressão do Ki-67 ou a densidade microvascular com as variáveis: tamanho do tumor, extensão extra-ovariana da doença, atividade mitótica, atipia celular e padrão histológico.

4. Não foi detectada significância estatística na relação entre a expressão do PCNA ou do Ki-67 e a densidade microvascular dos casos.

7. Referências Bibliográficas

ALA-FOSSI, S. L.; MÄENPÄÄ, J.; AINE, F.; AINE, R.; KOIVISTO, P.; KOIVISTO, A. M.; SC, B.; PUNNONEN, R. - Prognostic significance of p53 expression in ovarian granulosa cell tumors. ***Gynecol. Oncol., 66***:475-9, 1997.

BERCHUCK, A.; KAMEL, A.; WHITAKER, R.; KERNS, B.; OLT, G.; KINNEY, R.; SOPER, J.T.; DODGE, R.; CLARKE-PEARSON, D.L.; MARKES, P. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer*.* ***Cancer Res.*****, 50**:4087-91, 1990.

BJORKHOLM, E. & PETTERSON, F. - Granulosa-cell and theca-cell tumors: the clinical picture and long-term outcome for the Radiumhemmet series. **Acta *Obstet. Gynecol. Scand., 59***:361-5, 1980.

BJORKHOLM, E.& SILFVERSWARD, C. - Prognostic factors in granulosa cell-tumors. ***Gynecol. Oncol., 11***:261-74, 1981**.**

BOMPAS, E.; FREYER, G.; VITREY, D.; TRILLET-LENOIR, V. - Granulosa cell tumor: review of literature. ***Bull. Cancer, 87***: 709-14, 2000.

BOOCOCK, C.A.; CHARNOCK JONES, D.S.; SHARKEY, A.M.; ACLAREN, J.; BARKER, P.J. WRIGHT, KA.A. TWENTYMAN, P.R.; SMITH,S.K. - Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt and kdr in ovarian carcinoma. ***J. Natl. Cancer Inst., 87***:506-16, 1995.

BOSARI, S.; LEE, A.K.; DELELLIS, R.A.; WILEY, B.D.; HEATLEY, G.J.; SILVERMAN, M.L. - MICROVESSEL quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. ***Hum. Pathol., 23***:755-61, 1992.

BRACHNER, P. - Quality assurance: An accreditation perspective. ***Lab. Medicine, 20***:159-62, 1989.

BRAVO, R. & CELIS, J.E. - A search for differential polypeptide synthesis throughout of the cell cycle of HeLa cells. ***J. Cell Biol., 84***:795-802, 1978.

BRAVO, R. & MACDONALD-BRAVO, H. - Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during cell cycle: Association with DNA replication sites. ***J. Cell Biol., 105***:1549-54, 1987.

BRAWER, M.K. - Quantitative microvessel density. A staging and prognostic marker for human prostatic carcinoma. ***Cancer, 78***:345-9, 1996.

BROWN, D.C. & GATTER, K.C. - Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. ***Histopathology, 17***:489-503, 1990.

BRUNO, S. & DARZYNKIEWICZ, Z. - Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody and HL-60. ***Cell. Prolif., 25***:31-40, 1992.

BURGDORF, W.H.; MUKAI, K.; ROSAI, J. - Immunohistochemical identification of factor VIII-related antigen in endothelial cells of cutaneous lesions of alleged vascular nature. ***Am. J. Clin. Pathol. 75***:167-71, 1981**.**

BYAR, D. P. - Identification of prognostic factors. In: BUYSE, M.E.; STAQUET, M.J.; SYLVESTER, R.J. - **Cancer clinical trials: methods and practice**. Oxford New York Toronto. Oxford University Press. 1984. p.423-43.

CARVALHO, F.M. - Câncer de ovário: anatomia patológica e classificação. In: ABRÃO, F.S. - **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo. Roca, 1995. p.415-26.

CASEY, G.; LOPEZ, M.E., RAMOS, J.C.; PLUMMER, S.J.; ARBOLEDA, E.J.; SHAUGHNESSY, M. - DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. ***Oncogene, 13***:1971-81, 1996.

COBB, M.A.; HUAIN, M.; ANDERSEN, B.J.; AL.-MEFTY, O. - Significance of proliferating cell nuclear antigen in predicting of intracranial meningioma. ***J. Neurosur., 84***:85-90, 1996.

COSTA, M.J.; WALLS, J.; AMES, P.; ROTH, L.M. - Transformation in recurrent ovarian granulosa cell tumors: Ki67 (MIB-1) and p53 immunohistochemistry demonstrates a possible molecular basis for the poor histopathologic prediction of clinical behavior. ***Hum. Pathol., 27***:274-81, 1996.

COSTELLO, P; McCANN, A.;CARNEY, D.N.;DERVAN, P.A. - Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. ***Hum. Pathol., 26***:1181-4, 1995.

CRONJÉ, H.S.; NIEMAND, I.; BAM, R.H.; WOODRUFF, J.D. - Review of the granulosa -theca cell tumors from the Emil Novak ovarian tumor registry. ***Am. J. Obstet. Gynecol., 180***:323-7, 1999.

DARNTON, S.J. - P53. ***J. Clin. Pathol. Mol. Pathol., 51***:248-53, 1998.

DEPASQUALE, S.E.; GIORDANO, A.; DONNENFELD, A.E. - The genetics of ovarian cancer: molecular biology and clinical application. ***Obstet. Gynecol. Surv., 53***:248-56, 1998.

DERCHAIN, S.F.M.; TORRES, J.C.; TEIXEIRA, L.C.; ANDRADE, L.A.L.A. - Tumores de células da granulosa do ovário: estadiamento e tratamento. ***Rev. Bras. Cancerol., 43***:107-10, 1997**.**

DEVICTOR, B.; BONNIER, P.; PIANA, L.; ANDRAC, L.; LAVAUT, M.N.; ALLASIA, C.; CHARPIN. - c-myc protein and Ki-67 antigen immunodetection in patients with uterine cervix neoplasia: correlation of microcytophotometric analysis and histological data. ***Gynecol. Oncol*.., 49**:284-90, 1993.

DIDDLE, A.W. & C'CONNOR, K.A. - Feminizing ovarian tumors and pregnancy. ***Am. J. Obstet. Gynecol., 62***:1071-8, 1951.

DINH, T.V.; HANNIGAN, E.V.; SMITH, E.R.; HOOVE M.J.; CHOPRA, V.; TO, T. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in stage Ib squamous cell carcinoma of the cervix. ***Obstet. Gynecol., 87***:751-4, 1996.

DISAIA, P.J. & CREASMAN, W.T. - Germ cell, stromal, and other ovarian tumors. In: DISAIA, P.J. & CREASMAN, W.T - **Clinical gynecologic oncology**. 5th ed. St. Louis, Missouri. Mosby-year Book, Inc. 1997, p.365-8.

ELTABBAKH, G.H.; BELINSON, J.L.; KENNEDY, A.W.; BISCOTTI, C.V.; CASSEY, G.; TUBBS, R.R. - p53 and HER-2/neu overexpression in ovarian borderline tumors. ***Gynecol. Oncol*.., 65**:218-24, 1997.

EVANS, A.J.; GAFFEY T.A.; MALKASIAN G.D.; ANNEGERS J.F. - Clinicopathologic review of 118 granulosa and 82 theca cell tumors. ***Obstet. Gynecol., 55***:213-8, 1980.

FINA, L.; MOLGAARD, H.V.; ROBERTSON, D.; BRADLEY, N.J.; MONAGHAN, P.; DELIA, D.; SUTHERLAND, D.R.; BAKER, M.A. GREAVES, M.F. - Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. ***Blood, 75***:2417-26, 1990.

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

FONTANELLI, R.; STEFANON B.; RASPAGLIESI,; F. KENDA, R.; TOMASIC, G.; SPATTI, G.; RIBOLDI, G.; DI DONATO, P.; PILOTTI, S.; De PALO, G. - Adult granulosa cell tumor of the ovary: a clinico pathologic study of 35 cases. ***Tumori, 84***:60-4, 1998.

FOX, H.; AGRAWAL, K.; LANGLEY, F.A. - A clinicopathologic study of 92 cases of granulosa cell tumor of the ovary with special reference to the factors influencing prognosis. ***Cancer., 35***:231-41, 1975.

FOX, H. & LANGLEY, F.A. - **Tumors of the ovary**. Chicago, Year Book Medical Publishers Inc., 1976.

FOX, S.B.; TURNER, G.D.H.; LEEK, R.D.; WHITEHOUSE, R.M.; GATTER, K.C.; HARRIS, A.L. - The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium. ***Breast Cancer Res. Treat., 36***:219-26, 1995.

GALLION, H.H.; PIERETTI, M.; DEPRIEST, P.D.; VAN NAGELL, J.R. - The molecular basis of ovarian cancer. ***Cancer (Supp), 76***:1992-7, 1995.

GARCIA, R.L.; COLTRERA, M.D.; GOWN, A.M. - Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin Monoclonal Antibodies in fixed, embedded tissues. ***Am. J. Pathol., 134***:733-9, 1989.

GARZETTI, G.G.; CIAVATTINI, A; GOTERI, G.; DE NICTOLIS M.; STRAMAZZOTTI, D.; LUCARINI, G.; BIAGNINI, G. - Ki67 antigen immunostaining (MIB 1 monoclonal antibody) in serous ovarian tumors: index of proliferative activity with prognostic significance. ***Gynecol. Oncol.,*** **56**:169-174, 1995**.**

GASPARINI, G.; WEIDNER, N.; BEVILACQUA, P.; MALUTA, S.; DALLA PALMA, P.; CAFFO, O.; BARBARESCHI, M.; BORACCHI, P.; MARUBINI, E.; POZZA, F. - Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. ***J. Clin. Oncol., 12***:454-66, 1994.

GEBHART,J.B.; ROCHE, P.C.; KEENEY, G.L.; LESNICK, T.G.; PODRATZ, K.C. - Assessment of inhibin and p53 in granulosa cell tumors of the ovary. ***Gynecol. Oncol., 7***:232-6, 2000**.**

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; AND STEIN H. - Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. ***Int. J. Cancer, 31***:13-20, 1983.

GERDES, J.; LEMKE,H.; BAISCH, h.; WACKER, H-H.; SCHWAB, U.; AND STEIN, H. - Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human antigen defined by monoclonal antibody Ki67. ***J. Immunol., 133***:1710-5, 1984.

GOULDING, H.; RASHID, N.A.; ROBERTSON, J.F.; BELL, J.A.; ELSTON, C.W.; BLAMEY, R.W. - Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? ***Hum. Pathol., 26***:1196-200, 1995.

GUIDI, A.J.; ABU-JAWDEH, G.; TOGNAZZI, K.; DVORAK, H.F.; BROWN, L.F. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptor in endometrial carcinoma. ***Cancer., 78*:**454-60, 1996.

GUINTOLI, R.L.; CELEBRE, J.A.; WU,C.H.; WHEELER, J.E.;MIKUTA, J.J. - Androgenic function of granulosa cell tumor. **Obstet**. **Gynecol., 47:**77-9, 1976.

GRABAU, D.A.; NIELSEN, O.;HANSEN, S.; NIELSEN, M.M.;LÆNKHOLM, A.V.; KNOOP, A.; PFEIFFER, P. - Influence of storage temperature and high-temperature antigen retrieval buffers on results of immunohistochemical staining in sections stored for longs periods. **App. Immunohist.,6**:209-13, 1998.

GURUSINGHE, C.J.; HEALY, D.L.; JOBLING, T.; MAMERS, P.; BURGER, H.G.- Inhibin and activin are demonstrable by immunohistochemistry in ovarian tumor tissue. ***Gynecol. Oncol., 57***:27-32, 1995.

HABA, R.; MIKI,H.; KOBAYASHI, S.; AND OHMORI, M. - Combined analysis of flow cytometry and morphometry of ovarian granulosa cell tumor. ***Cancer, 72*:**3258-62, 1993.

HALL, P.A.; LEVISON, D.A.; WOODS, A.L.; YU, C.C.; KELLOCK, D.B.; WATKINS, J.A.; BARNES, D.M.; GILLETT, C.E.; CAMPLEJOHN, R.; DOVER, R. - Proliferating nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. ***J. Pathol.,162***:285-94, 1990.

HARRISON-WOOLRYCH, M.L.; SHARKEY, A.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; SMITH, S.K. - Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in human myometrium and leiomyomata. ***J. Clin. Endocrinol. Metab., 80***:1853-8, 1995.

HENRIKSEN, R.; STRANG, P.; WILANDER, E; BACKSTROM, T.; TRIBUKAIT, B.; OBERG, K. **-** p53 expression in epithelial ovarian neoplasms: relationship to clinical and pathological parameters, Ki-67 expression and flow cytometry. ***Gynecol. Oncol.,* 53**:301-6, 1994.

HILDEBRANDT, R.H.; ROUSE, R.V.; LONGACRE, T.A. - Value of inhibin in the identification of granulosa cell tumor of ovary. ***Hum. Pathol., 28***:1387-95, 1997.

HITCHCOCK,C.L.; NORRIS, H.J.; KHALIFA, M.A.; AND WARGOTZ, E.S. - Flow Cytometric analysis of granulosa tumors. **Cancer., 64:**2127-32, 1989.

HOLLAND, D.R.; LE RICH, J.; SWENERTON, K.D.; ELIT, L.; AND SPINELLI, J. - Flow cytometric assessment of DNA ploidy is a useful prgnostic factor for patients with granulosa cell ovarian tumors. ***Int. J. Gynecol. Cancer., 1***:227-32, 1991.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C.C. - P53 mutations in human cancers. ***Science., 253***:49-53, 1991.

HORAK, E.R.; LEEK, R.; KLENK, N.; LEJEUNE, S. SMITH, K.; STUART, N.; GREENALL, M.; STEPNIEWSKA, K.; HARRIS, A.L. - Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. ***Lancet, 340***:1120-4, 1992.

HORNY, H.P.; MARX, L.; KROBER, S.; LUTTGES, J.; KAISELING, E.; DIETL, J. - Granulosa cell tumor of the ovary. Immunohistochemical evidence of low proliferative activity and virtual absence of mutation of the p53 tumor-suppressor gene. ***Gynecol. Obstet. Invest.,*****7**:133-8, 1999.

HOWANITZ, P.Z. - Quality Assurance measurements in Departments of Pathology and laboratory medicine. ***Arch. Pathol. Lab. Med.114***: 1131-5, 1990.

INOUE, M.; FUGITA, M.;ENOMOTO, T.; MORIMOTO, H.; MONDEN, T.; SHIMANO, T. - Immunohistochemical analysis of p53 in gynecologic tumors. ***Am. J. Clin. Pathol. 102***:665-70, 1994.

ISOLA, J.; KALLIONIEMI, O.P.; KORTE, J.M.; WAHLSTROM, T.; AINE, R.; HELLE, M.; HELIN, H. - Steroid receptors and Ki-67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: correlation with DNA flow cytometry, biochemical receptor assay, and patient survival. ***J. Pathol., 162***:295-301, 1990.

KACINSKI, B.M.; MAYER, A.G.; KING, B.L.; CARTER, D.; CHAMBERS, S.K. - NEU protein overexpression in benign, borderline and malignant ovarian neoplasms. ***Gynecol. Oncol., 44*:**245-53, 1992.

KALAVATHI, N. - Granulosa-cell-tumor-hormonal: 362 aspects and radiosensitivity. ***Clin. Radiol., 22***:524-7, 1971.

KELMAN, Z. - PCNA: structure, functions and interactions. ***Oncogene. 14***:629-40, 1997.

KESARI, A.L.; CHELLAM, V.G.; NAIR, P.P.; AHMED, I.; MACHAVAN, J.; THOMAS, P.A.; NAIR, K.; PILLAI, M.R. - p53 tumor supressor protein and tissue proliferative fraction in infiltrating ductal carcinoma***. J. Surg. Oncol., 65***:159-163, 1997.

KING, L.A., OKAGAKI, T.; GALLUP, D.G.; TWIGGS, L. B.; MESSING, M.J.; CARSON, L.F. - Mitotic count, nuclear atypia, and immunohistochemical determination of Ki-67, c-myc, p21-ras, c-erbB-2, and p53 expression in granulosa cell tumors of the ovary: mitotic count and ki-67 are indicators of poor prognosis. ***Gynecol .Oncol., 61***:227-32, 1996.

KIRSCHNER, C.V.; ALANIS-AMEZCUA, J.M.; MARTIN, V.G.; LUNA, N.; MORGAN, E.; YANG, J.J. - Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator? ***Am. J. Obstet. Gynecol., 174***:1879-84, 1996.

KOHLER, M.F.; KERNS, B.J. HUMPHREY, P.A.; MARKS, J.R.; BAST, R.C.J. ; BERCHUCK, A. - Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. ***Obstet. Gynecol., 81***:643-50, 1993.

KOHLER, M.F.; CARNEY, P.; DODGE, R.; SOPER, J.T.; CLARKE-PEARSON, D.L.; MARKS, J.R.; BERCHUCK, A. - p53 overexpression in advanced-stage endometrial adenocarcinoma. ***Am. J. Obstet. Gynecol., 175***:1246-52, 1996.

KUPRYJANCZYK, J.; THOR, A.; BEAUCHAMP, R.; MERRITT, V.; EDGERTON, S.M.; BELL, D.A.; YANDELL, D.W. - p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer . ***Proc. Natl. Acad Sci. USA., 90*:**4961-5, 1993.

KUPRYJANCZYK, J.; BELL, D.A.; YANDELL, D.W.; SCULLY, R.E.; THOR, A.D. - p53 expression in ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. ***Am. J. Clin. Pathol., 102***:671-6, 1994.

LANDIS, J.R. & KOCH, G.G. The management of observer agreement for categorical data. ***Biometrics, 33***: 159-174, 1977.

LAUSZUS, F.F.; PETERSEN, A.C.; GREISEN, J.; JAKOBSEN, A. - Granulosa cell tumor of ovary: a population based study of 37 women with stage I disease. ***Gynecol. Oncol., 81***:456-60, 2001.

LEE, W.L.; YUAN, C.C.; LAI, C.R.; WANG, P.H. - Hemoperitoneun is an initial presentation of recurrent granulosa cell tumors of the ovary. ***Jpn.J.Clin.Oncol., 29***:509-12, 1999.

LIU, F.S.; HO, E.S.C.; LAI, C.R.; CHEN, J.T.; SHIH, R.T.P.; YANG, C.H.; TSAO, C.M. - Overexpression of p53 in not a feature of ovarian granulosa cell tumors. ***Gynecol. Oncol., 61***:50-3, 1996.

MAEDA, K.;GHUNG, Y.S.; ONODA, N.; OGAWA, M.; KATO, Y.; NITTA, A.; ARIMOTO, Y.; KONOD, Y.; ARAKAWA, T.; SOWA, M. - Association of tumor cell proliferation with lymph node metastasis in early gastric cancer. ***Oncology, 53***:1-5, 1996.

MALMSTRÖM, H.; HÖGBERG, T.; BJÖRN R.; SIMONSEN, E. - Granulosa cell tumor of ovary: Prognostic factors and outcome. ***Gynecol. Oncol., 52***: 50-5, 1994.

MARKS, J.R.; DAVIDOFF, A.M.; KERNS, B.J.; HUMPHREY, P.A.; PENCE, J.C.; DODGE, R.K.; CLARKE-PEARSON, D.L.; IGLERHART, J.D.; BAST, R.C.J.; BERCHUCK, A. - Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. ***Cancer Res., 51***:2979-84, 1991.

MARTIN, L.; GREEN, B.; RENSHAW, C.; LOWE, D.; RUDLAND, P.; LEINSTER, S.J.; WINSTANLEY, J. - Examining the technique of angiogenesis assessent in invasive breast cancer. ***Br. J. Cancer, 76***:1046-54, 1997.

MATZUK, M.M.; FINEGOLD, M.J.; SU, J.G.; HSUEH, A.J.; BRADLEY, A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. ***Nature, 360***:313-9, 1992.

MAY, P. & MAY, E. - Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the protein. ***Oncogene, 18***: 7621-36, 1999.

MEDEN, H.; MARX, D.; ROEGGLEN, T.; SCHAUER, A.; KUHN, W. - Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) and response to chemotherapy in patients with ovarian cancer. ***Int. J. Gynecol. Pathol., 17*:**61-5, 1998.

MILIARAS, D.; KAMAS, A.; KALEKOU, H. Angiogenesis in invasive breast carcinoma: is it associated with parameters of prognostic significance? ***Histopathology, 26***:165-9, 1995.

MINGUILLON, C.; SCHöNBORN, I.; RELES, A.; BARTEL, U.; LICHTENEGGER, W. - EGF-R and PCNA expression in ovarian carcinomas - correlation with classic prognostic factors. ***Gen. Diagn. Pathol., 141***:197-201, 1996.

MORGAN, K.G.; WIKINSON, N.; BUCKLEY, C.H. Angiogenesis in endometrial carcinoma. ***Int. J. Gynecol. Cancer, 6***:385-8, 1996.

MORRIS, J.M. & SCULLY, R.E. - **Endocrine pathology of the ovary**, Mosby, St. Louis, 1958. p.65-81.

NAKASHIMA, N.; YOUNG, R.H.; SCULLY, R.E. – Androgenic granulosa cell tumors of the ovary: A clinicopathological analysis of seventeen cases and review of literature. ***Arch. Pathol. Lab. Med., 108***:786-9, 1984.

NORRIS, H.J. & TAYLOR, H.B. – Virilization associated with cystc granulosa tumors. ***Obstet. Gynecol, 34***:629, 1969.

OBERMAIR, A,; KURZ, C.; CZERWENKA, K.; THOMA, M.; KAIDER, A.; WAGNER, T.; GITSCH, G.; SEVELDA, P. - Microvessel density and vessel invasion in lymph-node-negative breast cancer: effect on recurrence-free survival. ***Int. J. Cancer, 62***:126-31, 1995.

OZOLS, R.F.;RUBIN, S.C.; THOMAS, G.; ROBBOE, S. - Epithelial ovarian cancer. In: HOSKINS, W.J.; PERES,C.A.; YOUNG, R.C. - **Principles and practice of gynecologic oncology.** Philadelphia, New York, Lippincott, Raven, 1996. p.919-86.

PAGE, D.L. & JENSEN, R.A. - Angiogenesis in human breast carcinoma: what is the question? ***Hum Pathol., 26*:**1173-4, 1995.

PARUMS, D.V.; CORDELL, J.L.; MICKLEM, K.; HERYET, A.R.; GATTER, K.C.; MASON, D.Y. - JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. ***J. Clin. Pathol., 43***:752-7, 1990.

PAULETTI, G.; GODOLPHIN, W.; PRESS, M.F.; SLAMON, D.J. - Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. ***Oncogene, 13***:63-72, 1996.

PAULETTI, G.; DANDEKAR, S.; RONG, H.; RAMOS, L.; PENG, H.; SESHADRI, R.; SLAMON, D.J. - Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. ***J. Clin. Oncol., 18***:3651-64, 2000.

PENAULT-LLORCA, P.; ADELAIDE, J.; HOUVENAEGHEL, G.; HASSOUN, J.; BIRNBAUM, D.; JACQUEMIER, J. - Optimization of immunohistochemical detection of erbB2 in human breast cancer: impact of fixation. ***J. Pathol., 173***:65-75, 1994.

PINTO, B.C.; ANDRADE, L.A.L.A.; DERACHAIN, S.F.M. - Accuracy of intraoperative frozen section diagnosis of ovarian tumors. ***Gynecol. Oncol., 81***:230-2, 2001.

POWELL, J.L.; CONNOR, P.; HENDERSEN, G.S. - Management of recurrent Juvenile granulosa cell tumor of the ovary. ***Gynecol. Oncol., 81***:113-6, 2001.

PRESS, M.F.; HUNG, G.; GODOLPHIN, W.; SLAMON, D.J. - Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples; Potential source of error in the immunohistochemical studies of oncogene expression. ***Cancer Res., 54*:**2771-7, 1994.

PRESS, M.F.; BERNSTEIN, L.; THOMAS, P.A.; MEISNER, L.F.; ZHOU, J.Y.; MA, Y.; HUNG, G.; ROBINSON, R.A.; HARRIS, C.; EL-NAGGAR, A.; SLAMON, D.J.; PHILLIPS, R.N.; ROSS, J.S.; WOLMAN, S.R.; FLOM, K.J. - HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. ***J. Clin. Oncol., 15***:2894-904, 1997.

RAMANI, P.; BRADLEY, N.J.; FLETCHER, C.D. - QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. ***Histopathology, 17***:237-42, 1990.

REITMAIER, M.; RUDLOWSKI, C.; BIESTERFELD, S,; RATH, W.; SCHRODER, W. - Comparative studies on the biological significance of the marker for proliferation Ki-67-Antigen and PCNA in primary ovarian carcinoma. ***Zentralbl Gynakol.,12***:361-7, 2000.

ROSS, J.S.; SHEEHAN, C.; HAYNER-BUCHAN, A.M.; AMBROS, R.A.; KALLAKURY, B.V.; KAUFMAN, R.; FISHER, H.A.; MURACA, P.J. - HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. **Hum. Pathol., 28:**827-33, 1997.

ROSS, J.S. & FLETCHER, J.A. - The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. ***Semin. Cancer Biol. 9***:125-38, 1999. [Review].

RUBIN, S.C.; FINSTAD, C.L.; FREDERICI, M.G.; SCHEINER, L.; LLOYD, K.O.; AND HOSKINS, W.J. - Prevalence and significance of HER-2/neu expression in early epithelial ovarian cancer. ***Cancer, 73***:1456-9, 1994.

SCOTT, R.J.; HALL, P.A.; HALDANE, J.S.; VAN NOORDEN, S.; PRICE, Y.; LANE, D.P.; WRIGHT, N.A. - A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. ***J. Pathol., 165***:173-8, 1991.

SCULLY, R.E. - Histological typing of ovarian tumours. WHO, 2nd ed., 1999.

SEROV, S.F.; SCULLY, R.E.; SOBIN, L.H. - International histological classification of tumors, n° 9. **Histological typing of ovarian tumors**. Bull World Health, Genova, organ, 1973.

SJOGREN, S.; INGANAS, M.; NORBERG, T.; LINDGREN, A.; NORDGREN, H.; HOLMBERG, L.; BERGH, J. - The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. ***J. Natl. Cancer Inst.,88***:173-82,1996.

SHIVJI, K.K.; KENNY, M.K.; WOOD, R.D. - Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. ***C*ell., *69***:367-74, 1992.

SHOLZEN, T.& GERDES, J. - The Ki-67 protein: from the known and the unknown. ***J. Cell. Physiol., 182***:311-22, 2000.

SLAMON, D.J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L.A.; HOLT, J.A.; WONG, S.G.; KEITH, D.E.; LEVIN, W.J.; STUART, S.G.; UDOVE, J.; ULLRICH , A. - Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. ***Science.,* 12**:707-12, 1989.

STENWIG, J.T.; HAZEKAMP, J.T.; BEECHAM, J.B. - Granulosa cell tumor of the ovary: a clinicopathological study of 118 cases with long-term follow-up. ***Gynecol. Oncol., 7***:136-9, 1979.

TAKEBAYASHI, Y.; AKIYAMA, S.; YAMADA, K.; AKIBA, S.; AKIOU, T. - Agiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. ***Cancer, 78***:226-31, 1996.

TENERIELLO, M.; EBINA, M.; LINNOILA, R.I.; HENRY, M.; NASH, J.D.; PARK, R.C. - p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. ***Cancer Res., 53***:3103-9, 1993.

TEIXEIRA, L.C. - **Detecção e correlação prognóstica da ciclina PCNA no carcinoma mamário**. Campinas, 1993. [Tese - Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP].

TYSON, F.L.; BOYER, C.M.; KAUFMAN, R.; O'BRIANT, K.; CRAM, G.; CREWS, J.R.; SOPER, J.T.; DALY, L.; FOWLER, W.C. Jr.; HASKILL, J.S. - Expression and amplification of the HER-2/neu (c-erbB-2) protooncogene in epithelial ovarian tumors and cell lines. ***Am. J. Obstet. Gynecol.,*** **165**:640-6, 1991.

VAN DIEST, P.J.; BRUGAL, G.; BAAK, J.P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. ***J. Clin. Pathol., 51***:716-24, 1998.

VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K.W. - P53 function and dysfunction. ***Cell., 70***:523-6, 1992.

WABERSICH , J.; FRACAS, M.; MAZZER, S.; MARCHETTI, M.; ALTAVILLA, G. - The value of the prognostic factors in ovarian granulosa cell tumors. ***Eur. J. Gynaecol. Oncol.,19***:69-72, 1998.

WEIDNER, N.; FOLKMAN, J.; POZZA, F.; BEVILACQUA, P.; ALLRED, E.N.; MOORE, D.H.; MELI, S.; GASPARINI, G. - Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. ***J. Natl. Cancer. Inst., 84***:1875-87, 1992.

WERNER, M.; CHOTT, A.; FABIANO, A.; BATTIFORA, H. - Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. ***Am. J.Surg. Pathol., 24***:1016-19, 2000.

WESTHOLM, B. – Granulosa cell tumors of the ovary. - A restrospective analysis (meeting abstract). ECCO-4. **Fourth European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing**. Federation of European Cancer. Madrid, societies,.p.229, 1987.

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

WU, L.; ZHANG, W.; LI, L. - Prognostic factors in granulose cell tumor of the ovary. ***Zhonghua fu chan ke za zhi., 35***:673-6, 2000.

YING, S.Y. - Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. ***Endocr. Rev., 9***:267-93. Review, 1988.

YOUNG, R.H.; DICKERSIN, G.R.; SCULLY, R.E. - Juvenile granulosa cell tumor of the ovary: a clinicopathologic analysis of 125 cases. ***Am. J. Surg. Pathol., 8***: 575-96, 1984.

YOUNG, R.H. & SCULLY, R.E. - Sex cord-estromal , steroid cell, and other ovarian tumors with endocrine, paraendocrine, and paraneoplastic manifestations. In: KURMAN, R.J. BLAUSTINE'S - **Pathology of the female genital tract**. 3ª ed., New York, Springer-Verlag, 1987. p.607-58.

ZHENG, J.P.; ROBINSON, W.R.; EHLEN, T.; YU, M.C.; DUBEAU,L. - Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the bases of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. ***Cancer Res., 51***:4045-51, 1991.

8.Bibliografia de Normatizações

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

HERANI, M.L.G. – Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98.

9. Anexos

9.1. Anexo 1

Diagnóstico histológico e expressão dos marcadores p53, c-erbB-2, Ki-67, PCNA e CD34 em pacientes portadoras de tumor de células da granulosa do ovário

Ficha de registro de informações Ficha número: _____

1. ***Seleção dos sujeitos***

1.1. Impressão diagnóstica inicial

Patologista A: _____ Patologista B: _____

1.2. Concordância: sim |_| (passe para 1.4) não |_|

1.3. Impressão diagnóstica do patologista _____

1.4. Unanimidade entre os patologistas: sim |_| não |_|

Se sim passe para 1.6.

1.5. Inibina: positiva|_| negativa |_|

1.6. Diagnóstico final de TCGO: sim |_| não |_|

2. ***Dados patológicos***

2.1. Padrão histológico

	Patologista A	**Patologista B**	**Conclusão ou Patologista C**
Microfolicular			
Macrofolicular			
Trabecular			
Insular			
Sólido ou difuso			
Giriforme			

2.2. Atipia celular

	ausente	**pouca atipia (+1)**	**atipia moderada (+2)**	**Atipia severa (+3)**
Patologista A				
Patologista B				
Conclusão ou Patologista C				

2.3 Atividade mitótica

	≤ 2 mitoses	**>2 mitoses**
Patologista A		
Patologista B		
Conclusão ou Patologista C		

3. ***Dados clínicos***

3.1 Idade no momento do diagnóstico |__|

3.1.1 Sintoma ao diagnóstico: _____

3.2 Data da cirurgia: __/__/__ 3.3 Tamanho do tumor: ____cm

3.4 Estádio da doença ao diagnóstico: I |_| II |_| III |_| IV |_|

3.5 Extensão extra-ovariana da doença: sim |_| não |_|

3.6 Rotura intraoperatória: sim |_| não |_|

3.7 Quimioterapia: sim |_| não |_| (passe para 3.9)

3.8 Data de início: __/__/__ Data de término: __/__/__

3.9 Esquema: _____

3.10 Radioterapia: sim |_| não |_| (passe para 3.12)

3.11 Data de início: __/__/__ 3.12 Data de término: __/__/__

3.13 Recidiva: sim |_| não |_| 3.14 Data da recidiva: __/__/__

3.15 Morte: sim |_| não |_| 3.16 Data da morte: __/__/__

3.17 Data da última consulta: __/__/__

3.18 Estado da paciente na última consulta:

viva sem doença |_| viva com doença: |_| morte |_|

4. ***IHQ***

4.1. p53:

4.1.1 Porcentagem de área corada:
patologista A__% patologista D:__%

4.1.2 Positivo |_| Negativo |_|

4.2 c-erbB-2:

4.2.1 patologista A: Positivo +1 |_| +2 |_| +3 |_| +4 |_| Negativo |_|
patologista D: Positivo +1 |_| +2 |_| +3 |_| +4 |_| Negativo |_|

4.2.2 Positivo |_| Negativo |_|

4.3 Ki-67:

4.3.1 Porcentagem de células positivas: patologista A __% patologista D __%

4.3.2 Baixo índice de proliferação |_| (se ≤20%)
Alto índice de proliferação |_| (se >20%)

4.4 PCNA:

4.4.1 Patologista A: Positivo |_| Negativo |_|
Patologista D: Positivo |_| Negativo |_|

4.4.2 Positivo |_| Negativo |_|

4.5 :CD34

4.5.1 Intensidade da coloração:

	Densidade microvascular				Atividade angiogênica
	Campo1	Campo 2	Campo 3	média	
Patologista A					
Patologista D					
Média A/D					

HC:_____/__

Nome: _____

9.2. Anexo 2 - Quadros, diagramas e figuras

Quadro 1: Fatores prognósticos em TCGO: revisão da literatura

Autor/ano	n	Fatores clínicos e cirúrgicos								Fatores histológicos		
		Idade	Quadro clínico	Tamanho do tumor	Extensão extraovariana	Ascite	Tratamento	Ruptura intraoperatória	Estádio	Mitose	Atipia	Padrão histológico
FOX, et al., 1974	92	Sig	Sig [3]	Sig	Sig	-	-	-	Sig (bil)	Sig	NS	Sig
STEMWIG et al., 1979	118	Sig	-	-	-	-	-	Sig	Sig	Sig	Sig	NS
BJÓRKHOLM & PTERSON, 1980	198	NS[1]	-	Sig[1, 2]	-	-	NS	Sig[1,2]	Sig[1,2]	Sig[1]	Sig[1,2]	NS[1]
EVANS et al., 1980	118	-	-	-	-	-	-	-	Sig	Sig	-	-
MALMSTRÖM et al, 1994	54	-	-	-	-	-	-	-	Sig	Sig	-	-
FONTANELLI et al., 1997	35	-	-	-	Sig	-	-	-	-	-	-	-
CRONJÉ, et al.,1999	97	-	-	NS	-	Sig	-	NS	Sig (bil)	-	-	-
WU et al., 2000	100	NS	-	Sig	-	-	NS (QT adjuvante)	-	Sig	Sig	-	-
LAUSZUS et al., 2001	37	-	-	-	-	-	Cirúrgico Conser-vador x Pan-HTA	-	-	-	-	-

NS; não significante; Sig: significante; 1: Apenas para o estádio I; 2: análise multivariada; 3: massa abdominal palpável; QT: quimioterapia; bil: bilateralidade

Quadro 2: Taxa de expressão do p53 em tumores de células da granulosa do ovário e seu valor prognóstico, conforme os vários autores da literatura

Autor/ano	n	Taxa de expressão (%)	Tempo de seguimento (min, máx)	Anticorpoe diluição	Correlação com outros fatores	Valor prognóstico
COSTA et al. (1996)	68	19	6,3 (1; 30,7)	D0-7 1:400	tipo juvenil Ki-67	ausente
LIU et al. 1996	19	5	1987 a 1994*	PAb 1801 1:100	ausente	ausente
KING et al. (1996)	40	72	7,9 (0; 47)	D07 1:50	ausente	ausente
ALA-FOSSI et al. (1997)	30	37	7,4 (0; 22)	DO-7 1:300	estádio	presente
HORNY et al. (1999)	11	9	DND	DO-7	ausente	ausente
GEBHART et al. (2000)	47	57	13,6 (0; 37,6)	DO-7 1:200	ausente	presente

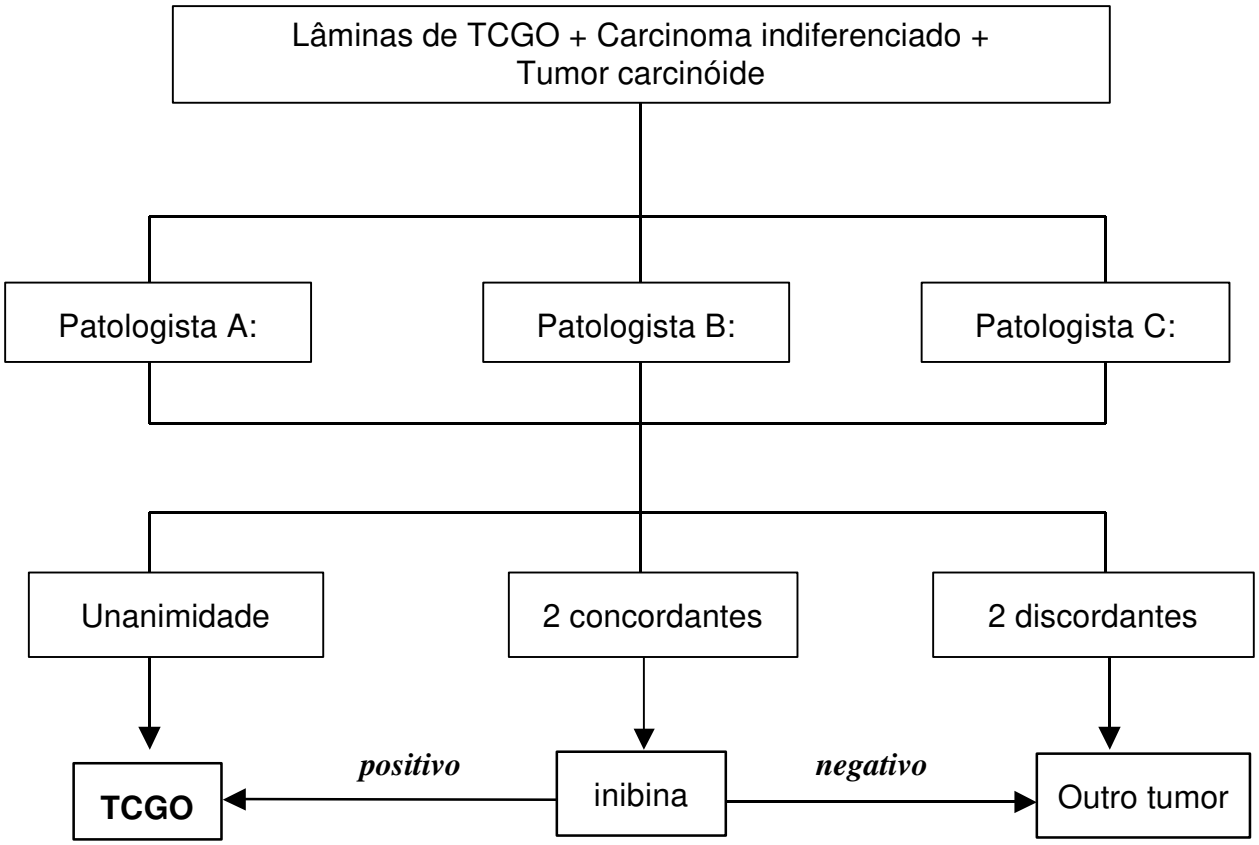
*ano de início e término do seguimento, respectivamente; DND: Dados não disponíveis

Quadro 3: Desempenho da classificação da concordância interobservadores conforme índice *kappa*

Coeficiente *kappa*	Desempenho da classificação
$\leq$ 0,00	Pobre (poor)
0,01 – 0,20	Desprezível (sligth)
0,21 – 0,40	Suave (fair)
0,41 – 0,60	Moderado (moderate)
0,61 – 0,80	Substancial (substancial)
0,81 – 1,00	Quase perfeito (almost perfect)

LANDIS & KOCH, 1977

Diagrama 1: Fluxograma para o estabelecimento de diagnóstico de TCGO através da avaliação histológica e reação IHQ para inibina



Quadro 4: Anticorpos utilizados no estudo, origem , diluição e controles positivos

Marcador	Clone / Anticorpo	Indústria	Diluição	Controles positivos
P53	D07	DAKO	1:100	Lâminas de carcinoma de mama sabidamente positivas para p53
c-erbB-2	Policlonal	DAKO	1:300	Lâminas de carcinoma de mama sabidamente positivas para c-erbB-2
Ki-67	Ki-S5	DAKO	1:50	Lâminas de linfonodo sabidamente positivas para Ki-67
PCNA	PC10	DAKO	1:300	Lâminas de carcinoma de mama sabidamente positivas para PCNA
CD34	Q BEND/10	DAKO	1:25	Lâminas de linfonodo sabidamente positivas para CD34

HARRISON-WOOLRYCH et al., 1995.

Quadro 5: Sensibilidade dos vários anticorpos anti-c-erbB-2

Anticorpo	Sensibilidade (%)
9C2	82
R60 [1]	80
A8010 [1]	75
A485 [1]	70
pAb# [1]	65
3H4	59
4D5	57
36B7	54
135C6	53
7F3	51
3B5	50
21N [1]	47
H6C38	42
TAB250 [1]	36
6E9	31
145WW	30
2H11	28
3E8	24
TA-1	22
5B8	18
7C2	14
2C4	8
7D3	7
PAB [1]	6

1: Policlonal (os demais são monoclonais); PRESS et al., 1994.

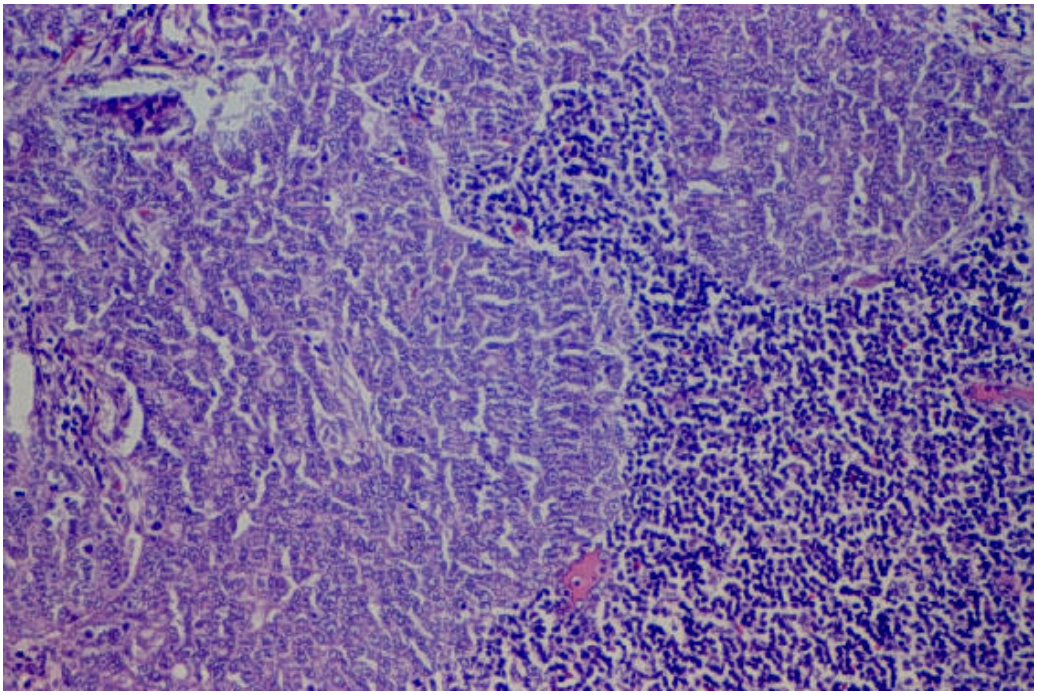


Figura 1. *Fotomicrografia do caso 2, inicialmente diagnosticado como sendo TCGO, reclassificado como carcinoma indiferenciado, tumor carcinóide e carcinoma indiferenciado, respectivamente pelos patologistas A, B e C (H&E, 200x).*

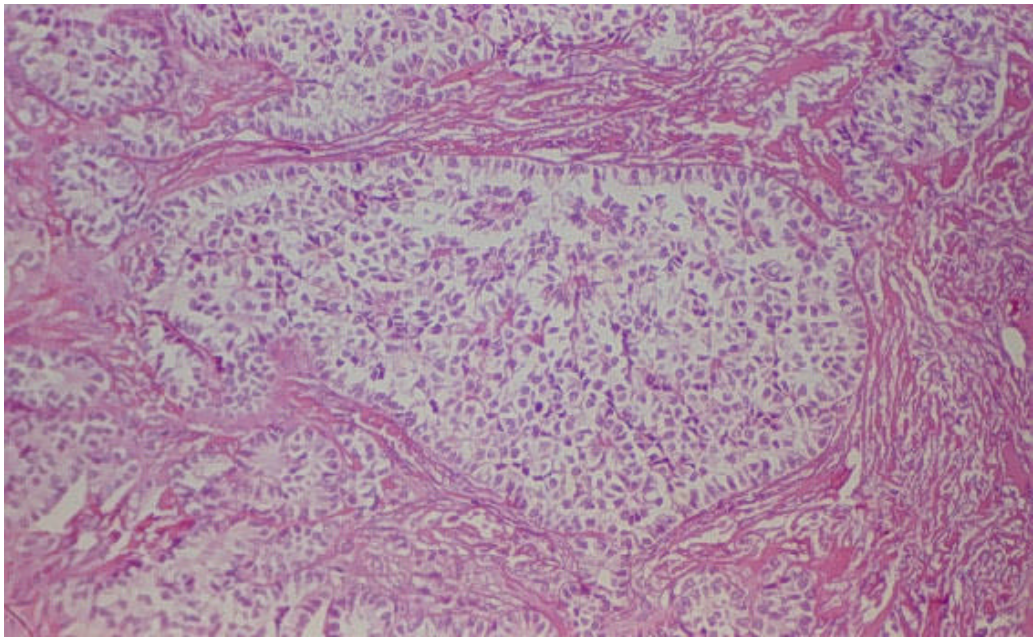


Figura 2. *Fotomicrografia do caso 25, classificada como TCGO pelos patologistas A, B e como carcinoma indiferenciado pelo patologista C. Ao centro pode-se notar corpúsculos de Call-Exner. (H&E, 200x).*

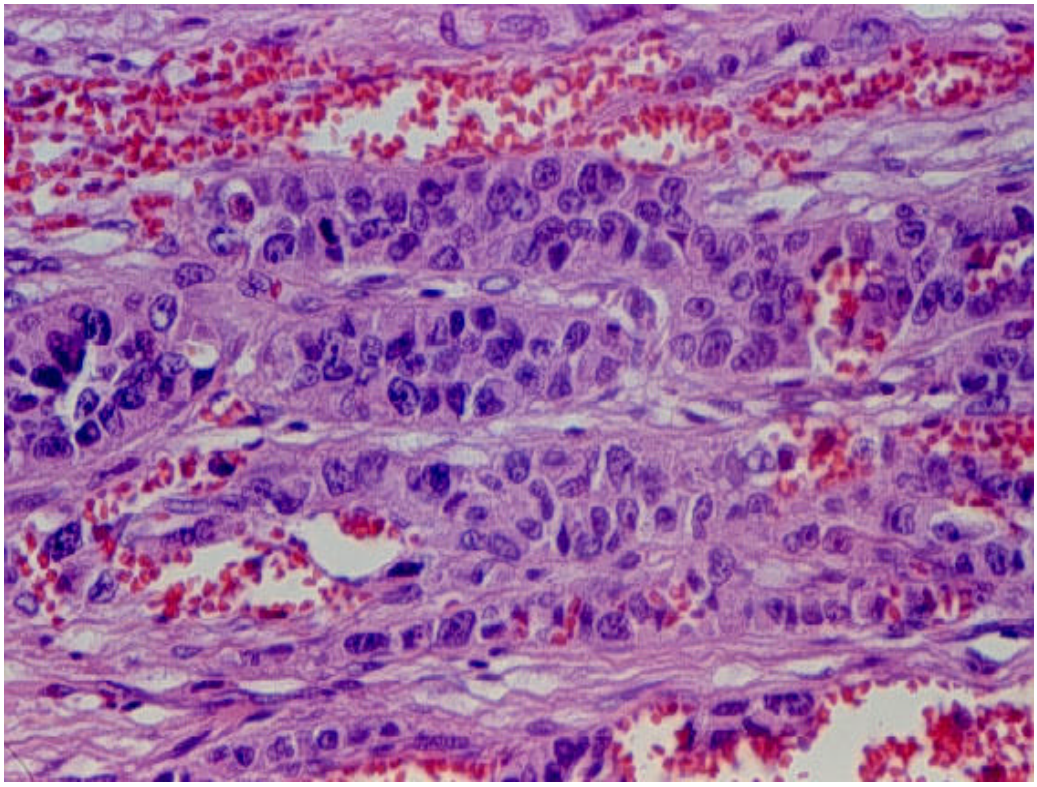


Figura 3. *Fotomicrografia do caso número 25. Pode-se notar figuras de mitose (H&E, 400x).*

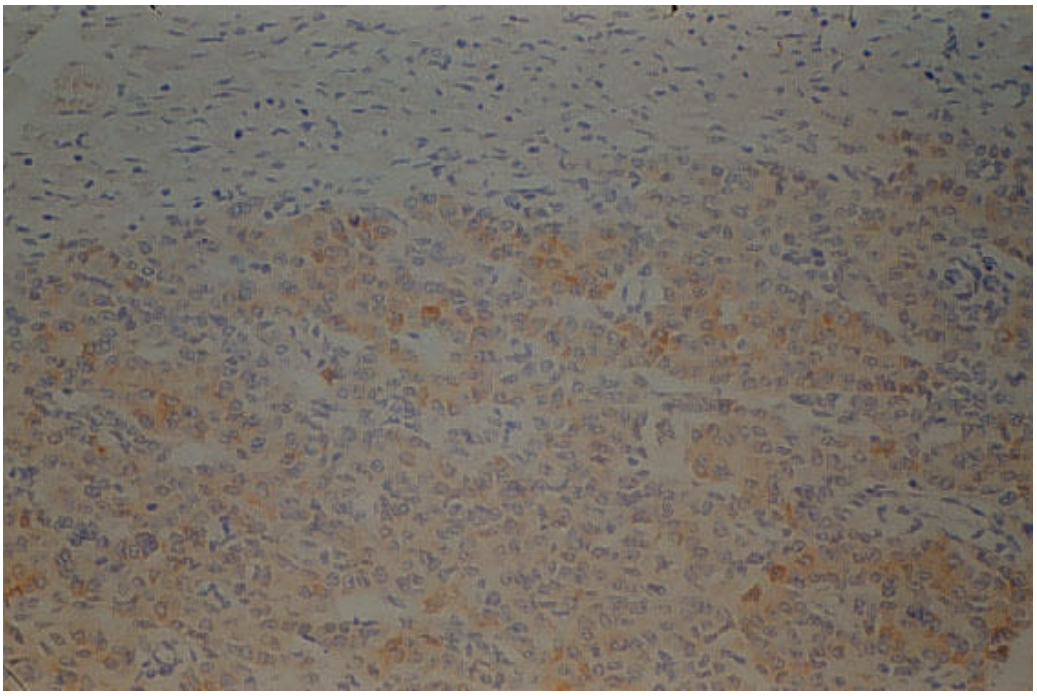


Figura 4. *Fotomicrografia do caso 25, reação positiva para inibina (200x).*

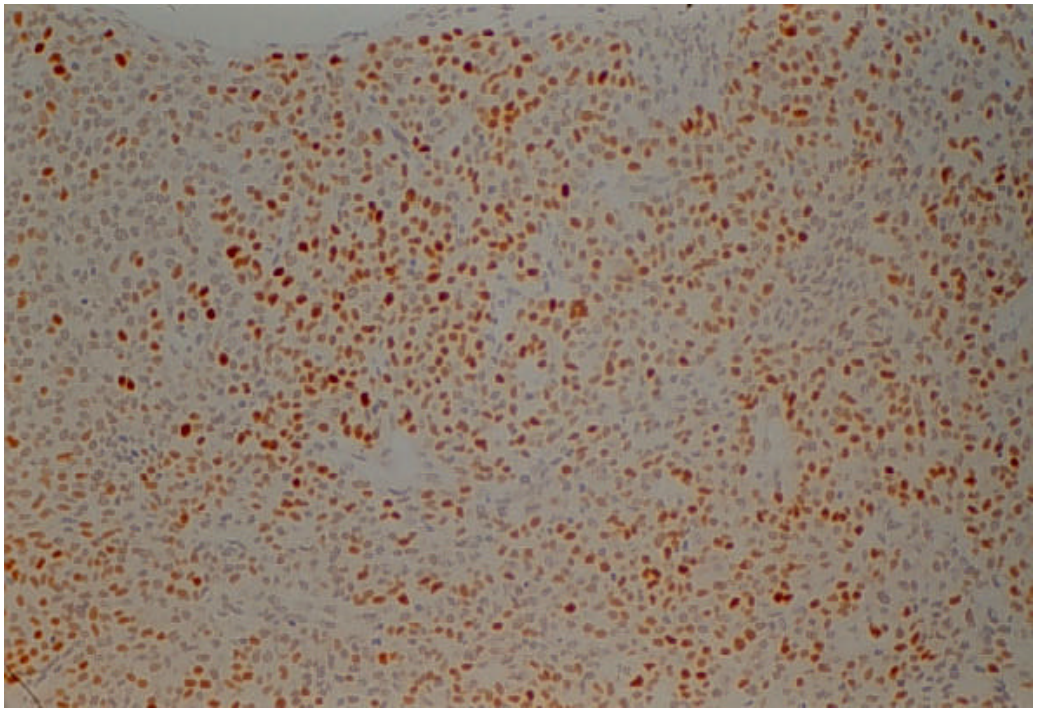


Figura 5. *Fotomicrografia do caso número 15. Reação positiva para p53 (200x).*

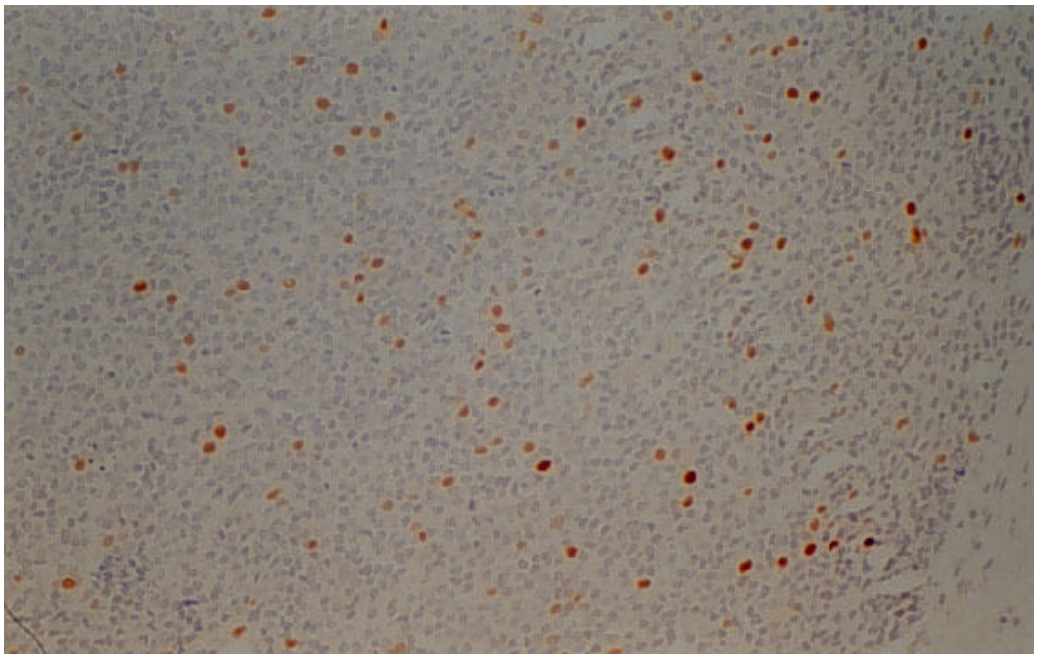


Figura 6: *Fotomicrografia do caso número 15. Reação positiva para Ki-67 (200x).*

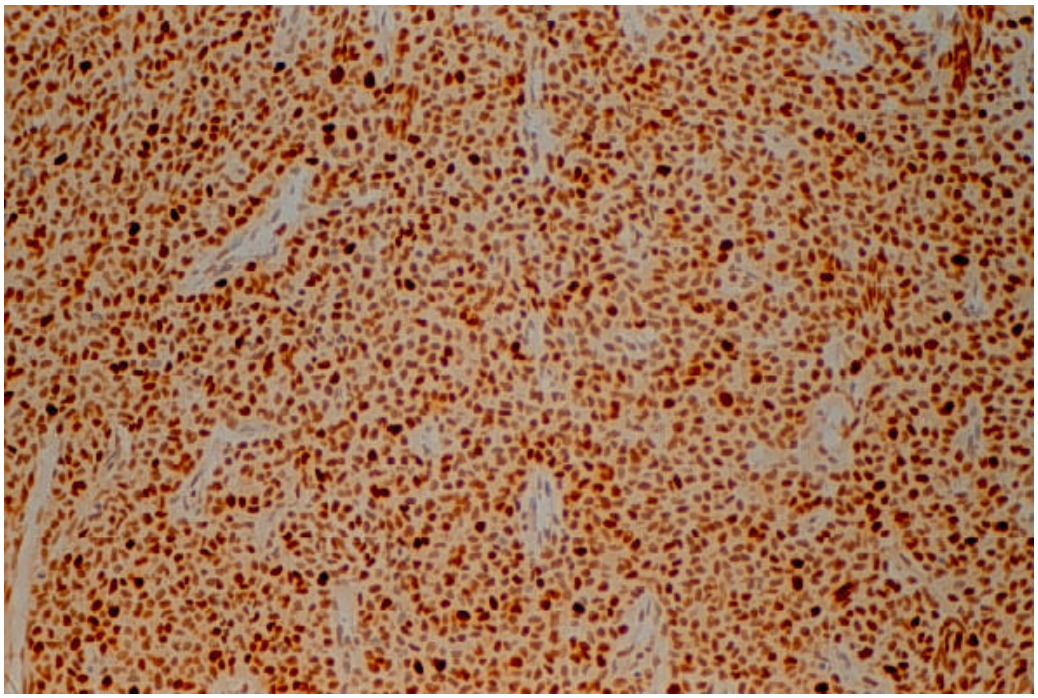


Figura 7. *Fotomicrografia do caso número 15. Reação positiva para PCNA (200x).*

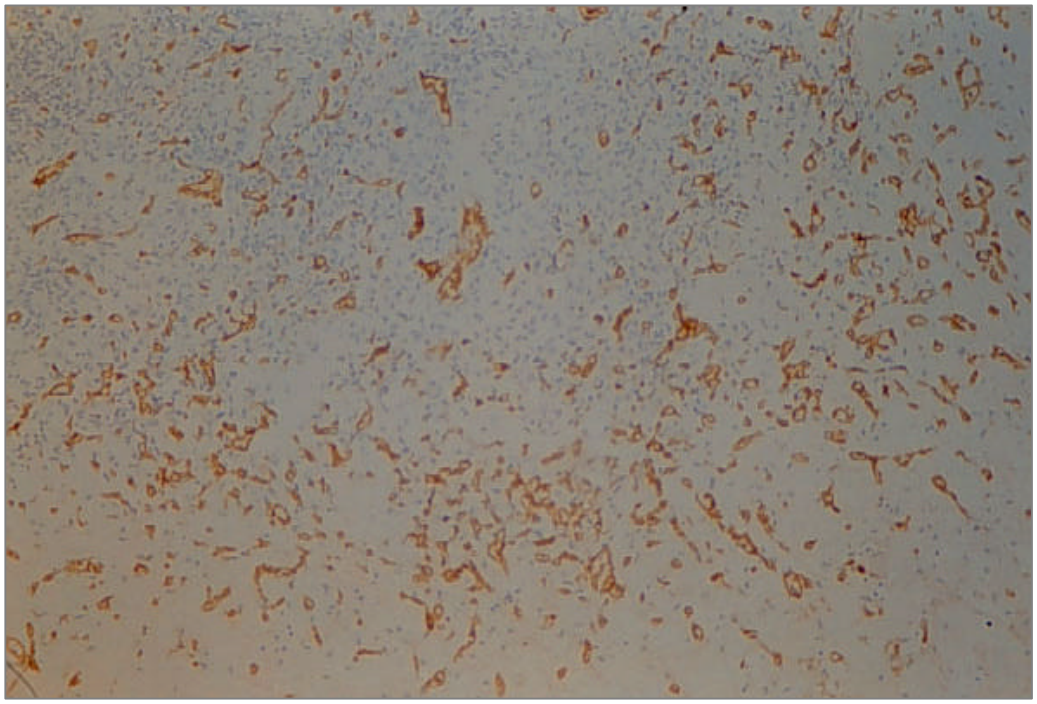


Figura 8. *Fotomicrografia do caso número 19. Marcação de vasos com anticorpo anti-CD34; (200x).*

9.3. Anexo 3

Características clínicas e cirúrgicas das pacientes

A idade média das pacientes foi de 53 anos (18 a 80 anos). Dez (55%) pacientes apresentaram apenas como queixa principal, na época do diagnóstico, algum tipo de sangramento seja ela pós-menopáusica ou irregularidade menstrual; 2 (11%), dor pélvica; 2 (11%) aumento do volume abdominal e/ou tumor; finalmente, 2 (11%) não apresentaram nenhum sintoma. Uma (6%) paciente apresentou queixas simultâneas de sangramento e tumor; 1 (6%) dor e tumor abdominal.

Oito (44%) pacientes foram submetidas a estadiamento cirúrgico completo, 6 (35%) a pan-histerectomia associada ou não a omentectomia/apendicectomia, 1 (6%) a salpingo-ooforectomia unilateral, 1 (6%) a salpingo-ooforectomia bilateral e 1 (6%) a somente omentectomia.

A rotura intra-operatória do tumor ocorreu em 4 casos. Apenas uma paciente apresentou tipo histológico juvenil sendo as demais, tipo adulto. Doze (67%), 5 (28%) e 1 (5%) pacientes foram estadiadas como I, III e IV, respectivamente. Ou seja, a proporção de casos avançados foi de 33% (IC95%: 11,4% a 53,5%).

A quimioterapia adjuvante (incluindo a platina) foi utilizada em 8 (44%) pacientes. Cinco (28%) pacientes receberam o esquema carboplatina e ciclofosfamida, 2 (11%) carboplatina, ciclofosfamida e adriamicina e 1 platina, vimblastina e bleomicina (5%). O seguimento médio foi de 45,3 meses (0,7 a 128,8) e ao final do período de acompanhamento 11 pacientes apresentavam-se vivas sem evidência de doença, 3 vivas com doença em atividade, 2 haviam morrido e 1 paciente apresentou perda de seguimento. As causas de óbito foram por progressão da doença e a outra por complicação pós-operatória de herniorrafia. Cinco casos recidivaram após um seguimento médio de 43,2 meses: 2 no pulmão, 1 no fígado e 2 em pelves. As sobrevidas global e livre de doença em cinco anos foram de 88,9% e 87,5%, respectivamente (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Sobrevida global em 21 pacientes com tumor de células da granulosa do ovário

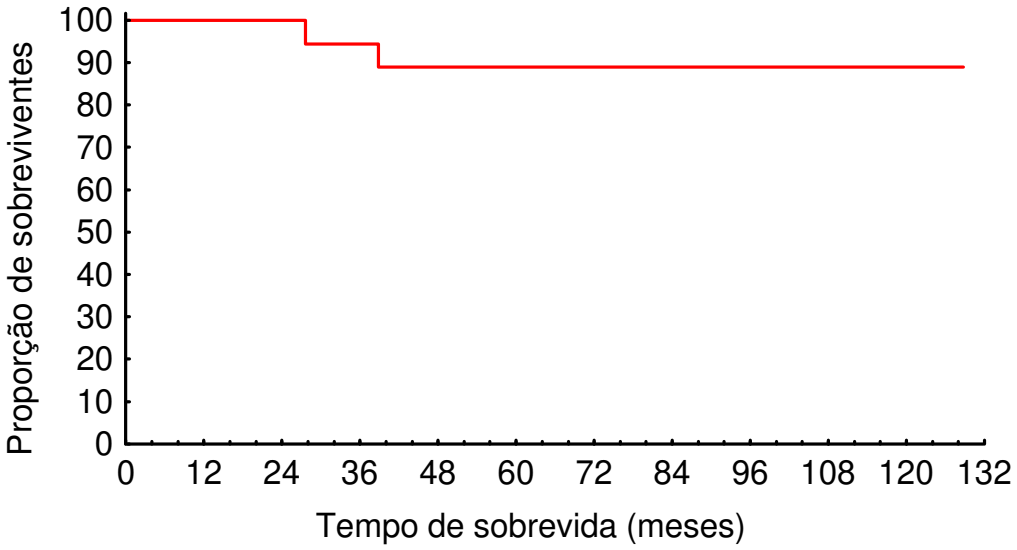
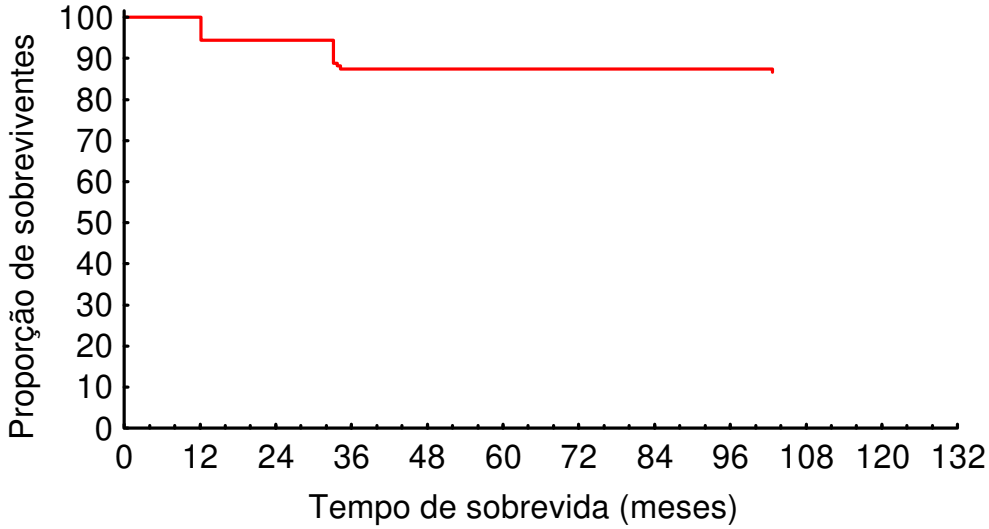



Figura 2: Sobrevida livre de doença em 21 pacientes com tumor de células da granulosa do ovário