

PATRÍCIA PATURY BORBA

**Expressão da Ciclo-oxigenase-2 e do Ki67 em
tumores *borderline* serosos e mucinosos de ovário**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

**Unicamp
2008**

PATRÍCIA PATURY BORBA

**Expressão da Ciclo-oxigenase-2 e do Ki67 em
tumores *borderline* serosos e mucinosos de ovário**

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

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

**Unicamp
2008**

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

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

B644e Borba, Patrícia Patury
Expressão da Ciclo-oxigenase-2 do Ki67 em tumores
borderline de ovário. / Patrícia Patury Borba. Campinas, SP :
[s.n.], 2008.

Orientador : Sophie Françoise Mauricette Derchain
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ovários. 2. Ovários-Cancer. 3. Tumor *borderline* de
ovário. I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 expression in
serous and mucinous ovarian borderline tumors**

Keywords: • Ovary
• Ovary-Cancer
• Borderline ovarian tumor

Titulação: Mestre em Tocoginecologia
Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Sophie Françoise Mauricette Derchain
Prof. Dr. Robério Damião
Prof. Dr. Renato Torrezan

Data da defesa: 27 – 08 - 2008

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: PATRÍCIA PATURY BORBA

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

Membros:

1.

SOP - DER

2.

Roberto de Souza Raul

3.

Raul

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

Data: 27/08/2008

Dedico este trabalho...

Aos meus ancestrais.

Representados aqui pelo meu avô materno Edil Patury Monteiro,
que desde a infância me incentivou à leitura e estudos,
me convencendo de que o prazer e a dedicação, a alegria e a seriedade
podem caminhar juntos.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sophie Derchain pela excelente orientação, pela sua impressionante agilidade mental, pelo incentivo e sensibilidade, pela paciência e compreensão, pelos ensinamentos científicos e de vida, pela amizade.

À Dra. Adriana Yoshida pela amizade, delicadeza e companheirismo, pelo incentivo, pela credibilidade no tema escolhido, pelos recortes das lâminas e pelos trabalhos em laboratório.

Ao Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sarian pela presteza, solicitude e amizade em todos os momentos ao longo do projeto.

À Dra. Priscila Marshall pelo compromisso e dedicação, pela imensa ajuda na contagem celular.

À Profa. Dra. Liliana Andrade pelos ensinamentos anatomo-patológicos na leitura das lâminas, pelo incentivo, gentileza e amizade.

Ao Dr. Luiz Mathias pela confiança, por acreditar no projeto desde o momento da seleção para a pós-graduação e pelo apoio institucional do Serviço de Ginecologia Oncológica do INCA.

Aos queridos amigos da pós-graduação por toda a inesquecível experiência que juntos vivenciamos: Carlos Henrique Debenedito Silva, Claudia Naylor, Neli Muraki Ishikawa, Fabíola Kestelman, Juliano Sbalchiero, Rosilene Pinheiro, Cláudia Camisão, Karen Lombardelli, Rita de Cássia B Silva, Lucília Zardo, Maria Luíza Bernardo Vidal, César Lasmar, Carlos Vicuña, Ademilson Caldas.

Ao Dr. Paulo Antônio Silvestre de Faria pelas contribuições na idealização do projeto, pelo apoio institucional do Departamento de Patologia do INCA.

Ao Dr. Fábio Carvalho de Barros Moreira pela presteza e solicitude. Pela avaliação dos casos do INCA, pela revisão cuidadosa dos casos controversos, pela classificação dos implantes, pela amizade.

À Dra. Maria Inês Pereira da Silva Vianna pela leitura das lâminas dos casos do INCA, pela delicadeza e objetividade, pelo incentivo e sabedoria.

Ao Dr. Francisco Pignataro pela ajuda no momento dos registros fotográficos dos casos.

Aos ex- residentes de anatomia-patológica do INCA pelo auxílio especializado Viviane Precci e Rodrigo Moraes.

À Luciana Bitana pela imensa ajuda no INCA na identificação das lâminas, na busca dos blocos, pela amizade, confiança e presteza em todos os momentos .

À amiga Edna Martins pela alegria, entusiasmo e contínuo apoio da secretaria de Ginecologia Oncológica do INCA.

Aos amigos médicos do Departamento de Ginecologia do INCA que me apoiaram ao longo da pós graduação, principalmente às Dras. Lina Vieira, Vanessa Franco, Claudia Bessa e aos Drs. Gustavo Carvalho, Renato SanMartin e Gustavo Guitmann.

Aos residentes de Cirurgia Oncológica do INCA que são meus grandes incentivadores na arte de ensinar e aprender.

Às pacientes, que mesmo sendo um estudo retrospectivo, possibilitaram a realização deste projeto.

A todos os funcionários do Setor de Arquivo Médico pela ajuda na seleção dos prontuários.

À Margarete Souza Donadon, secretária da pós-graduação, pelo apoio durante os trâmites burocráticos.

Ao Prof Dr Luiz Cláudio Santos Thuler pelo incentivo e dedicação na formação da pós graduação no INCA.

À Prof^{ra} Dr^a Marisa Maria Dreyer Breitenbach, responsável pela Coordenação de Pesquisa (CPQ) do INCA, decisiva e autêntica em muito momentos.

À Prof^{ra} Dr^a Joana Fróes Bragança Bastos e ao Prof Dr Renato Torrezan pelos importantes comentários e sugestões da banca no momento da qualificação.

À minha bela mãe Vera Patury pelo grande entusiasmo, confiança e ajuda em todos os momentos.

Ao meu grande irmão Marcelo Patury pela tranquilidade e apoio sempre.

Ao meu querido marido Marcio Ricciardi pela compreensão, apoio e alegria, por tornar a minha vida mais suave e feliz .

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

O estudo teve a participação dos Departamentos de
Tocoginecologia e Anatomia Patológica da Faculdade de
Ciências Médicas da Unicamp, do Serviço de
Ginecologia Oncológica do Instituto Nacional de Câncer
(INCA, HC II) e Anatomia Patológica do INCA; e do
Laboratório de Patologia Experimental do CAISM

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	X
Resumo	XI
Summary	XIV
1.Introdução	17
2.Objetivos	35
3.Publicação	36
4.Conclusões	58
5.Referências Bibliográficas	59
6.Anexos	70
6.1. Anexos 1-Ficha de coleta de dados para tumores <i>borderline</i> de ovário	70
6.2. Anexo 2- Listagem das mulheres incluídas no estudo	71
6.3. Anexo 3- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa das Instituições	73
6.3.1. Instituto Nacional do Câncer	73
6.3.2. Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP	76

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

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

Resumo

Introdução: os tumores *borderline* serosos e mucinosos de ovário formam um grupo especial de neoplasias, que difere dos tumores benignos e malignos das mesmas linhagens histológicas. Os marcadores moleculares estão atualmente provendo informações sobre as características biológicas e o comportamento clínico de vários tumores, entre eles, os tumores *borderline*. A ciclo-oxigenase-2 (COX-2), uma enzima ligada ao processo inflamatório, é sabidamente correlacionada com a carcinogênese. Por outro lado, o Ki67, marcador de proliferação celular, é capaz de identificar alterações do controle do ciclo celular e da apoptose. **Objetivo:** comparar a expressão da COX-2 em tumores *borderline* de ovário, serosos e mucinosos e verificar se essa expressão está relacionada à atividade proliferativa celular, avaliada através da expressão do Ki67, à presença de implantes peritoneais e ao estágio da doença. **Sujeitos e métodos:** para este estudo descritivo de corte transversal, foram selecionados os blocos de parafina das mulheres com tumores *borderline* de ovário, tratadas entre Janeiro de 1998 a Dezembro de 2004 na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), São Paulo, e no Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brasil. Após revisão dos prontuários foram excluídas as mulheres grávidas no momento do diagnóstico, portadoras de outras neoplasias ou em uso registrado de antiinflamatórios não esteroidais. Todas as lâminas foram revisadas por dois patologistas e foram incluídos 86 casos de tumores *borderline* de ovário cujos blocos eram disponíveis para avaliação imunoistoquímica. Os tumores incluídos foram classificados como:

serosos (36), mucinosos (46) e seromucinosos (4). Foram avaliadas a expressão citoplasmática da COX-2 e a expressão nuclear do Ki67, determinadas por imunohistoquímica realizada nestes cortes de tumores *borderline* de ovário conservados em parafina. **Resultados:** A idade média das mulheres estudadas foi de 42,4 anos (desvio padrão 16,5) não havendo diferença significativa entre aquelas com tumores serosos, mucinosos ou seromucinosos ($p=0,62$). Setenta e uma mulheres apresentaram a doença em estágio I e apenas três apresentaram doença em estágio II. Entre as treze mulheres com implantes peritoneais, sete eram portadoras de tumores *borderline* serosos, três apresentavam tumores mucinosos e três, tumores seromucinosos, sendo a proporção de mulheres com implantes peritoneais e estágio III significativamente maior, em mulheres com tumores seromucinosos ($p=0,001$). A expressão nuclear do Ki67 foi maior nos tumores mucinosos (65,8%), em comparação com os serosos (25%) e seromucinosos (25%) ($p=0,001$). Após análises multivariadas observou-se que a expressão citoplasmática da COX-2 foi significativamente maior nos tumores serosos em comparação com os tumores mucinosos (68.5% vs 52.5%; $p<0.01$). Não houve diferenças na expressão da COX-2 entre os tumores seromucinosos versus mucinosos, e tumores seromucinosos versus serosos. A maior expressão citoplasmática da COX-2 esteve significativamente associada com uma maior expressão do Ki67 em todos os tipos histológicos ($p=0.03$). Por outro lado, a expressão da COX-2 não se relacionou com o estágio da doença nem com a presença de implantes peritoneais. **Conclusões:** Esses resultados indicam que a expressão da COX-2 é maior nos tumores *borderline* serosos de ovário do que nos mucinosos.

Também indicam que a COX-2 é uma boa preditora da proliferação celular pois, sua expressão aumenta com a expressão do Ki67. Entretanto, este estudo impede inferir se a COX-2 é uma moduladora do comportamento do tumor ou apenas um marcador de outros eventos biológicos já que não se associou com o estágio ou presença de implantes peritoneais.

Summary

Background: borderline serous and mucinous ovarian tumors form a special group of neoplasia, which differs from benign and malignant tumors of the same histological category. Molecular markers are currently providing information on the biological characteristics and clinical behavior of the ovarian tumors; among them, borderline tumors. Cyclooxygenase-2 (COX-2), an enzyme linked to the inflammation process, is known to correlate with carcinogenesis. On the other hand, the Ki67, a marker of cell proliferation, is capable of identifying abnormalities of the cell-cycle control system and apoptosis. **Objective:** to compare the expression of COX-2 in serous and mucinous borderline ovarian tumors and to evaluate whether this expression is related to cell proliferative activity, by its turn assessed with the expression of Ki67, to the presence of peritoneal implants and to the disease stage. **Subjects and methods:** for this cross-sectional descriptive study we selected paraffin blocks from women with borderline ovarian tumors, treated at the State University of Campinas, São Paulo, and at The National Institute of Cancer, Rio de Janeiro, Brazil, between January 1998 and December 2004. After revision of the medical records, women that were pregnant at the moment of diagnosis, that harbored other malignancies or that were using nonsteroidal antiinflammatory drugs were excluded. All slides were reviewed by two pathologists and 86 blocks were

selected to undergo immunohistochemical evaluation. The tumors that were included were categorized as: serous (36), mucinous (46) and seromucinous (4). The cytoplasmatic expression of COX-2 and the nuclear expression of Ki67 were determined with immunohistochemistry in slides obtained from these borderline tumor paraffin blocks. **Results:** the mean age of the women was 42.4 years (standard deviation 16.5), and there was no significant difference between the mean ages of women with serous, mucinous or seromucinous tumors ($p=0.62$). Seventy-one women had stage I disease and only three had stage II disease. Of the thirteen women with peritoneal implants, seven had serous borderline tumors, three had mucinous and three seromucinous tumors. The proportion of women with peritoneal implants and stage III disease was significantly higher among women with seromucinous tumors ($p=0.0001$). The nuclear expression of Ki67 was higher in mucinous tumors (65.8%) in comparison to serous (25%) and seromucinous (25%) ($p=0.001$). After multivariate analysis it was observed that the cytoplasmatic expression of COX-2 was significantly higher in serous tumors compared to mucinous (68.5% vs 52.5%; $p<0.01$). There were no differences regarding the expression of COX-2 comparing seromucinous versus mucinous and mucinous versus seromucinous. The higher cytoplasmatic expression of COX-2 was significantly associated with an increased expression of Ki67 in all histological types ($p=0.03$). On the other hand, the expression of COX-2 was not related to disease stage and peritoneal implants. **Conclusions:** these results indicate that the expression of COX-2 is higher in serous borderline ovarian tumors compared to mucinous ones. They also indicate that COX-2 is a good predictor of cell proliferation because its

expression increases in parallel to that of Ki67. However, this study does not allow concluding whether COX-2 is a modulator of the tumor's behavior or just a marker of other biological events, considering that it bore no relation to disease stage or peritoneal implants.

1. Introdução

Em 2007, nos Estados Unidos da América (EUA), foi estimado o diagnóstico de 22.430 novos casos de câncer de ovário; e no mesmo ano, 15.280 mulheres morreram da doença (American Cancer Society, 2008). O câncer de ovário é a quarta principal causa de morte por neoplasia maligna em mulheres americanas e corresponde a 5% de todas as mortes por câncer. A baixa taxa de sobrevida no câncer epitelial de ovário resulta do grande percentual de casos diagnosticados num estágio avançado da doença. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e na quimioterapia, a sobrevida permanece em torno de 45% em cinco anos (Jemal et al., 2007).

No Brasil, não há dados nacionais sobre a prevalência ou mortalidade do câncer de ovário, segundo Pascalicchio et al. (2000). No ano de 1999 houve uma incidência de câncer em geral entre as mulheres, com 134.400 casos ou taxa bruta de 170,79/100.000, e mortalidade anual de 48.300 mulheres ou taxa bruta de mortalidade de 60,66/100.000, sendo que relacionado à incidência do câncer do ovário no Brasil pode-se apenas tecer algumas ilações. O carcinoma de ovário é uma doença de baixa incidência populacional, com valores menores que 1.700 casos (taxa bruta inferior a 2,14). Dentre as lesões malignas dos órgãos genitais femininos ocupa a terceira posição, abaixo de colo do útero (primeira posição, com 20.650 mulheres e taxa bruta de 26,28) e corpo do útero (segunda posição, com 5.450 casos e taxa bruta de 6,89), e o acometimento anual tem

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

O ovário tem uma imensa capacidade de originar tumores das mais diversas linhagens histológicas, em qualquer época da vida. O epitélio superficial, as células germinativas e o estroma são as principais matrizes de neoplasias, sendo o epitélio de superfície do ovário a maior fonte destas alterações (Soslow, 2008). A neoplasia epitelial de ovário inclui tumores benignos, *borderline* e invasivos, e tem sido proposto que estas entidades patológicas possam representar uma seqüência de estágios na evolução do câncer ovariano (Powell, 1992). O epitélio superficial deriva do epitélio celômico embrionário, forma os ductos mullerianos, que darão origem ao útero, trompas e terço superior da vagina (Auersperg et al., 2001). Na região gonadal, este epitélio tem a capacidade de se diferenciar em várias estruturas, sendo que essa capacidade se mantém no ovário adulto e permite a diferenciação em epitélios tubário, endometrial e endocervical. Entretanto, estas células com possibilidade de diferenciação multipotencial e imatura, também são mais susceptíveis à transformação neoplásica (Auersperg et al., 2002). Apenas recentemente os eventos iniciais da progressão para neoplasia a partir do epitélio do ovário estão sendo estudados sendo que a cultura do epitélio de superfície ovariano é muito delicada. No entanto, já foi demonstrada experimentalmente a capacidade do desenvolvimento do carcinoma ovariano a partir da cultura do epitélio de superfície ovariana (Auersperg et al., 2001).

O carcinoma de ovário é constituído por diferentes tipos de doenças (Soslow, 2008). Por exemplo, existem distintos tipos biológicos entre os carcinomas de baixo e alto grau de diferenciação (Singer et al., 2002; Singer et al., 2005); a ligação genética e molecular da endometriose com os carcinomas endometrióides e de células claras parece evidente (Dinulescu et al., 2005; Kato et al., 2006; Korner et al., 2006); existe uma relação etiológica entre os tumores *borderline* serosos e os carcinomas serosos de baixo grau de diferenciação celular (Singer et al., 2002; Singer et al., 2005); e entre os tumores endometrióides *borderline* e os carcinomas endometrióides (Chen et al., 2005).

Recentemente, vários patologistas têm explicado a diferente evolução dos carcinomas ovarianos descrevendo duas vias carcinogênicas distintas (Singer et al., 2002; Shih et al., 2004; Shih et al., 2005; Dehari et al., 2007; McCluggage, 2008, Kurman et al., 2008). Uma das vias carcinogênicas incluiria os carcinomas serosos de baixo grau, carcinomas mucinosos, carcinomas endometrióides, tumores de Brenner malignos, e carcinoma de células claras que se desenvolveriam através de uma evolução de lesões precursoras benignas ou dos tumores *borderline* para tumores invasivos. Os precursores benignos incluem os cistoadenomas/adenofibromas nos casos de tumores serosos e mucinosos, e endometriose ou endometriomas nos casos de tumores endometrióides e células claras. Esses tumores são de crescimento lento, e se apresentam freqüentemente como grandes tumores anexiais, restritos ao ovário no momento do diagnóstico. Já, os tumores menos diferenciados, resultariam de uma outra via de carcinogênese e surgiriam diretamente do epitélio de

superfície do ovário sendo raramente associados com lesões precursoras e se desenvolveriam através do epitélio de superfície e dos cistos de inclusão ovarianos (Bell e Scully, 1994). Estes carcinomas incluem os carcinomas serosos moderadamente e pouco diferenciados, os tumores malignos mistos do mesoderma, chamados carcinosarcomas, e os carcinomas indiferenciados. Eles geralmente são detectados já na presença de disseminação peritoneal. Este modelo teórico considera o desenvolvimento da maioria dos carcinomas ovarianos, como dois tipos distintos de tumores (McCluggage, 2008) (Figura 1 e 2).

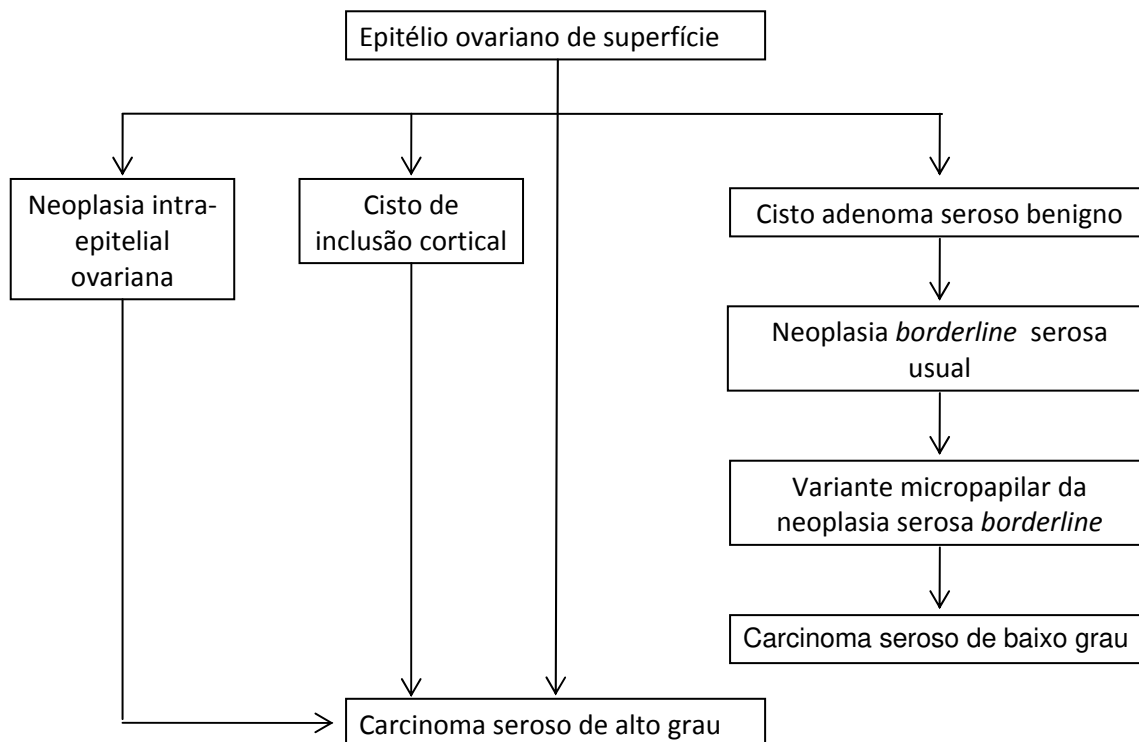


Figura 1: Vias de desenvolvimento dos carcinomas serosos de ovário de baixo e alto grau. *Adaptado de McCluggage, My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. J Clin Pathol, 2008, 61:152-163*

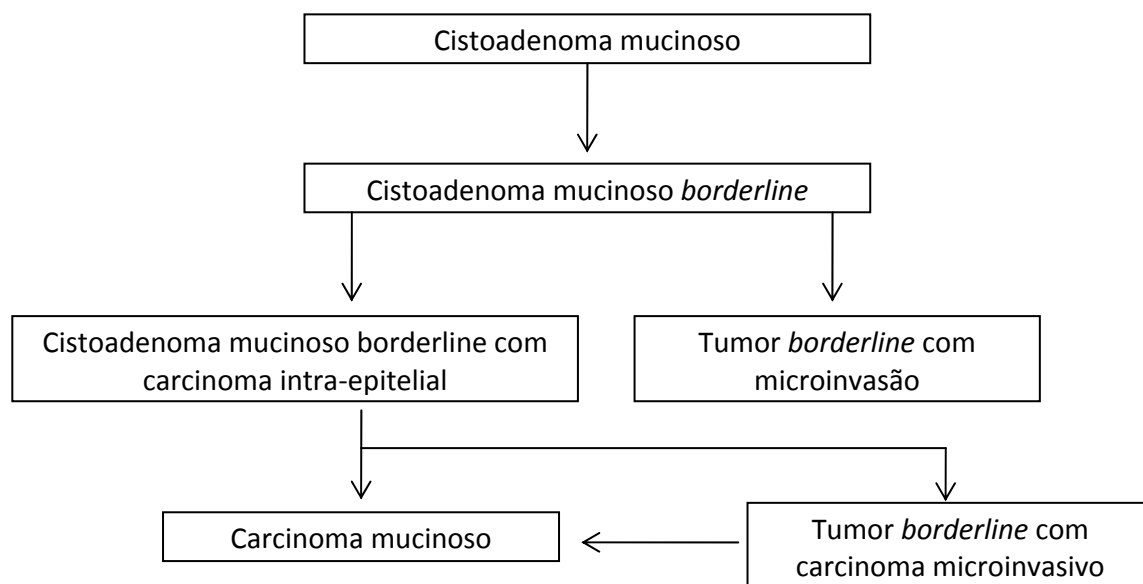


Figura 2: Vias de desenvolvimento dos tumores mucinosos do tipo intestinal. Adaptado de McCluggage, *My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. J Clin Pathol*, 2008, 61:152-163

Porém, é provável que em raras ocasiões o tumor de baixo grau se transforme num de alto grau ou um de alto grau evolua diretamente de um tumor seroso *borderline* (Dehari et al., 2007). É importante enfatizar, que não se trata de diferentes graus de diferenciação da mesma neoplasia, são dois distintos tipos tumorais com diferentes patogenias, eventos moleculares, comportamento e prognóstico (Singer et al., 2002; Shih et al., 2004; Shih et al., 2005; Dehari et al., 2007; McCluggage, 2008; Kurman et al., 2008).

Os tumores *borderline* de ovário têm sido identificados como tipos especiais de tumores epiteliais de ovário, com características histopatológicas e comportamento biológico intermediário entre os claramente benignos e os francamente malignos desde 1929 (Taylor, 1929). Este grupo de tumores tem sido denominado de várias maneiras, como carcinoma não invasor de baixo grau de diferenciação, cistoadenoma proliferativo sem invasão estromal, tumor de malignidade *borderline*, carcinoma de baixo grau de diferenciação maligna, ou tumor de baixo potencial de malignidade (Kottmeier, 1952). Em 1971, este grupo de tumores foi aceito pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) como carcinoma de baixo potencial de malignidade, e em 1973 a Organização Mundial de Saúde (OMS) o denominou tumor *borderline* (Serov et al., 1973).

Os tumores ovarianos *borderline* correspondem a 15% a 20% de todos os tumores malignos de ovário. Aproximadamente 3.000 casos são diagnosticados por ano em mulheres americanas (Link et al., 1996). Os tumores

borderline mais comuns são do tipo histológico seroso, seguido pelo mucinoso e muito raramente se apresentam de forma endometrióide, células claras e células transicionais, também chamado de tumor de Brenner. Histologicamente os tumores *borderline* serosos são definidos pela presença de um complexo ramo papilar, epitélio estratificado, atipia nuclear, atividade mitótica e ausência de invasão estromal no tumor. A distinção do *borderline* com o cistoadenoma é a presença de hiperplasia formando papilas e micropapilas associadas a um aglomerado de células, e atipia nuclear branda a moderada. O carcinoma se diferencia pela invasão estromal (Tavassoli e Devilee, 2003; Kurman et al., 2005). Os tumores *borderline* têm um comportamento mais indolente do que os carcinomas francamente invasores e são caracterizados pela sua apresentação em estágio precoce, longa sobrevida e recorrências tardias (Kurman e Seidman, 2005). Os fatores prognósticos favoráveis nos tumores *borderline* são o estágio inicial, o tipo histopatológico seroso e a idade abaixo de 40 anos no momento do diagnóstico. A recorrência tardia já foi descrita em 23 e 25 anos após o diagnóstico inicial (Seidman e Kurman, 2000). Há incerteza se os casos de recorrência são representados por metástases do tumor primário de ovário ou se seria um segundo tumor primário (Gershenson, 2002; Athanassiadou et al., 2008):

Merece destaque as diferentes faixas etárias correspondentes a maior incidência dos tumores epiteliais: os carcinomas invasivos ocorrem em mulheres numa média de idade de 52 anos; já os tumores *borderline* podem ocorrer em mulheres de todas as idades, mas apresentam maior incidência em

jovens, com média de idade de 40 anos. Podem ser diagnosticados em faixas etárias até 20 anos mais precoces do que são diagnósticos os carcinomas invasivos (Colombo et al., 1994; Trimble e Trimble, 1994; Ayhan et al., 2005; Wong et al., 2007).

Os tumores serosos *borderline* são histológica e clinicamente distintos dos tumores mucinosos *borderline* (Chapman, 2001). Os tumores *borderline* serosos caracterizam-se por excrescências polipóides e papilas ocupando o cisto, a superfície externa ovariana, ou ambos; e um certo grau de atipia nuclear (Soslow, 2008). Entretanto nem sempre é fácil diferenciar um tumor seroso *borderline* de um carcinoma seroso bem diferenciado. Os critérios usados para distinguir o tumor *borderline* seroso, do carcinoma seroso de baixo grau têm sido revistos em detalhes há alguns anos (Bell et al., 2004; Seidman et al., 2004).

Recentes publicações indicam que os carcinomas primários mucinosos de ovário são muito raros, representando menos de 3% de todos os carcinomas ovarianos (Seidman et al., 2003; Seidman et al., 2004). Apesar de serem pouco comuns representam a terceira posição na distribuição dos tumores em estágio I (Leitao et al., 2004). Os tumores mucinosos *borderline* são classificados em neoplasias mucinosas do tipo intestinal e mucinosos endocervical. Entre os tumores mucinosos de ovário, os mais frequentes são do tipo intestinal, e a maioria dos carcinomas mucinosos primários de ovário são transições do *borderline* mucinoso tipo intestinal para o carcinoma (Soslow, 2008). É

importante lembrar que os carcinomas mucinosos e os tumores *borderline* mucinosos associados com *pseudomixoma peritonei* são geralmente originários do apêndice (Ronnett et al., 1997). Os tumores do tipo endocervical, também conhecidos por tipos mucinosos mullerianos, ou seromucinosos, ou neoplasias mistas com componente mucinoso são muito mais raros, embora bem documentados. São tumores mistos do epitélio ovariano, e que se comportam clinicamente de forma similar ao tumor seroso *borderline* (Vang et al., 2006).

Os tumores *borderline* do ovário diferem dos carcinomas por não possuírem invasão franca do estroma, embora possam apresentar áreas de carcinoma intraepitelial e focos de microinvasão. O critério mais importante para definir carcinoma intraepitelial no tumor *borderline* é a severa atipia nuclear (Ronnett et al., 2004). Bell e Scully (1990) descreveram a microinvasão nos carcinomas serosos, distinguindo entre tumores *borderline* com microinvasão e tumores *borderline* com carcinoma microinvasivos com base no efeito estromal.

Os tumores *borderline* mucinosos possuem atipia citológica e figuras de mitoses. Existem critérios para distinguir os tumores mucinosos *borderline*, daqueles com focos de carcinoma intraepitelial, e dos carcinomas exibindo invasão franca. Nos carcinomas mucinosos primários de ovário, é comum se observar áreas benignas, áreas *borderline*, e outras *borderline* com carcinoma intraepitelial e malignas, lado a lado na mesma neoplasia. Os critérios que definem a presença ou ausência de invasão estromal envolvem: um arranjo com glândulas pequenas a intermediárias com uma confluência característica,

com mínima ou sem acometimento estromal; um crescimento de padrão cribiforme e um epitélio citologicamente maligno. Embora a microinvasão seja reconhecida, não há definição universal exata sobre o tamanho e o limite para ser considerada. A maioria dos autores utiliza 5mm, porém outros consideram 3mm ou 10mm² (McCluggage, 2008; Kurman e Shih, 2008; Soslow, 2008). Estabelecendo-se o diagnóstico de carcinoma mucinoso com infiltração estromal, sempre deve ser considerada a possibilidade de tratar-se de metástase de tumor do trato digestivo em ovário (Ronnett et al., 2004).

Cerca de 15% a 30% dos tumores *borderline* estão associados com implantes extraovarianos. A doença é mais comum nos tumores *borderline* serosos. Os implantes acometem as estruturas pélvicas, o omento e mais comumente o peritônio, e são classificados como invasores e não invasores pela sua apresentação histopatológica (Seidman e Kurman, 2000). Alguns casos podem apresentar implantes mistos, com os dois tipos associados (Gershenson, 2002). A arquitetura micropapilar dos tumores serosos *borderline* primários tem sido identificada como fator diretamente relacionado com a presença de implante peritoneal invasor (Seidman e Kurman 2000; Silverberg et al., 2004; Kurman et al., 2005). Alguns estudos demonstram que pacientes com implantes peritoneais invasores apresentam um pior prognóstico em relação aquelas com implantes não invasores. Em pacientes com implantes não invasores, cerca de 5% morrem pela doença comparado com os casos com implantes invasores, grupo em que 34% evoluem para óbito (Seidman e Kurman, 2000).

Os eventos moleculares diferem entre os carcinomas serosos ovarianos de baixo grau e os de alto grau de diferenciação (Shih et al., 2004). Os carcinomas de baixo grau são associados a k-ras ou mutação b-raf em aproximadamente dois terços dos casos (Sieben et al., 2004). Estas mutações são identificadas nos tumores de baixo grau no momento inicial da evolução, onde começam como áreas benignas ou *borderline* no mesmo tumor. As mutações k-ras e b-raf foram identificadas em cistoadenomas epiteliais e nos componentes *borderline* em 86% dos casos: a maioria dos cistoadenomas serosos são não neoplásicos, e alguns cistoadenomas são neoplásicos e podem ser precursores dos tumores serosos *borderline* (Ho et al., 2004; Allison et al., 2007). As mutações k-ras and b-raf não estão associadas aos tumores de alto grau, e nos de baixo grau não ocorrem simultaneamente na mesma neoplasia. Os carcinomas serosos de alto grau expressam significantes valores de p53, MIB1, bcl-2, ckit, Her-2 neu e p16; as duas neoplasias expressam WT1 em alto nível (O'Neill et al., 2005).

Poucos são os estudos sobre os eventos moleculares nos tumores seromucinosos *borderline* de ovário. Os tumores ovarianos mucinosos tipo intestinal exibem comumente mutações k-ras, e idênticas mutações tem sido demonstradas em áreas benignas, *borderline* e malignas da mesma neoplasia sugerindo que a mutação k-ras é um evento inicial na evolução (Scott e McCluggage, 2006). Mutações do b-raf não tem sido encontradas nas neoplasias mucinosas do tipo intestinal (McCluggage et al., 2008).

Paralelamente, várias hipóteses vêm sendo estudadas como potenciais fatores envolvidos no desenvolvimento do câncer de ovário. As teorias mais aceitas são relacionadas à ovulação incessante e inflamação. Na teoria da ovulação incessante, a ruptura folicular repetida leva à necessidade de reparo do epitélio de superfície ovariano a cada ovulação, possibilitando o aparecimento de alterações genéticas e câncer. Já a teoria da inflamação está relacionada diretamente com a ovulação, que se assemelha a um processo inflamatório: o pico de hormônio luteinizante pré-ovulatório estimula uma infiltração de leucócitos, produção de citocinas, mediadores de vasodilatação, ocorrendo reparo de DNA e remodelação tecidual, proporcionando um ambiente de estresse oxidativo que poderia progredir para o adenocarcinoma. Assim a inflamação parece desempenhar um papel na carcinogênese (Brewer et al., 2003).

Muita atenção tem sido focada no envolvimento da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), uma das duas isoformas da enzima COX, que é responsável pela síntese de prostaglandina a partir do ácido araquidônico (Chandrasekharan e Simmons, 2004). Estudos *in vitro* e pré-clínicos mostraram que a COX-2 apresenta uma elevada expressão associada as células cancerígenas em humanos com alto índice de inibição de apoptose, habilidade metastática e neoangiogênese (Liu et al., 2000; Rozic et al., 2001). A COX-2 não é expressa na maioria das células, mas é induzida e tem um papel no processo inflamatório (Williams e Dubois, 1996). Esta enzima tem sido descrita com um enfoque específico em várias neoplasias, onde foi avaliada a sua relação com a carcinogênese nos tumores de pulmão, cabeça e pescoço, colon e mama

(Choe et al., 2005; Mao et al., 2005; Alrawi et al., 2006; Gallicchio et al., 2006). A alta expressão da COX-2 na maioria dos tumores sólidos tem sido associada com os parâmetros de agressividade clinicopatológica e prognóstico desfavorável (Sinicrope e Gills., 2004). A expressão da COX-2 também foi analisada em cervicites e lesões pré-neoplásicas do colo uterino, e não foi observada relação entre este marcador e a gravidade das lesões cervicais (Sarian et al., 2006).

Estudos epidemiológicos relacionaram o uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais (AINE) com o processo anti-câncer. Os AINE exercem efeitos antiinflamatórios inibindo a síntese de prostaglandinas, através da inibição não específica das enzimas COX. Prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E2, desempenham ação na patogênese do câncer, devido aos efeitos secundários na mitogênese, adesão celular, sistema imunológico e apoptose (Marnett, 1992). Existem evidências de que o uso dessas drogas faça regredir lesões pré neoplásicas, como os pólipos cólon retais, presentes na síndrome de polipose adenomatosa familiar e, portanto suprimem a carcinogênese (Baron, 2003).

A COX-2 parece facilitar a progressão tumoral através da estimulação da proliferação e diferenciação celular, da imunossupressão, do incremento da angiogênese e da redução da apoptose (Fugimoto et al., 2006). Apesar de vários estudos epidemiológicos terem utilizado AINE não seletivos da COX, como a aspirina, que inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, apenas a

expressão da COX-2 nos tecidos ovarianos parece estar relacionada à carcinogênese. Observa-se uma associação entre a expressão da COX-2 e o grau de diferenciação da neoplasia ovariana, o prognóstico e o tempo de sobrevivência (Li et al., 2005; Raspollini et al., 2005; Raspollini et al., 2006), sendo esta associação relacionada com os parâmetros de agressividade, pior resposta à quimioterapia e prognóstico desfavorável (Denker et al., 2002; Ferrandina et al., 2002). Nos tumores *borderline* a expressão da COX-2 têm sido investigada em um pequeno número de estudos, que analisam uma pequena amostragem seriada (Dore et al., 1998; Matsumoto et al., 2001; Ferrandina et al., 2004).

O uso dos AINE pode estar relacionado a uma pequena diminuição do risco para carcinoma de ovário, mas os estudos não são conclusivos (Rosenberg et al., 2000). Uma metanálise realizada envolvendo dez estudos concluiu que o uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais não está associada à quimioprevenção do adenocarcinoma (Bonovas et al., 2005). Em outro estudo recente com mais de 500 casos de câncer de ovário observou-se uma diminuição de risco entre usuárias de AINE (Schildkraut et al., 2006).

Ferrandina et al. (2004) observaram uma difusa e intensa expressão da COX-2 no citoplasma dos tumores serosos *borderline*, enquanto que os tumores mucinosos do tipo intestinal exibiram uma baixa imunoreação da COX-2. Nas lesões benignas de ovário também foi observada uma positividade da COX-2 maior no tipo seroso do que no mucinoso. O subgrupo do tipo endocervical dos tumores *borderline* mucinosos apresentou uma expressão

mais significativa da COX-2, do que no tipo intestinal. Esta diferença na expressão do marcador tumoral evidenciou características clinicopatológicas, que foram analisadas de acordo com o diferente tipo histológico. Contudo, apenas nas lesões mucinosas houve um aumento progressivo da positividade da COX-2 no tipo intestinal *borderline* para tumores francamente malignos, sugerindo que a expressão positiva poderá estar envolvida com a carcinogênese ovariana (Cramer et al., 1998; Rosemberg et al., 2000; Dursun et al., 2005). Em recente estudo realizado por Yoshida et al. (2007) observou-se um aumento crescente da expressão da COX-2 comparando adenoma, com *borderline* e carcinoma. Esta seqüência ocorreu tanto nos tumores serosos quanto nos mucinosos; entretanto o aumento da expressão deste marcador na linhagem mucinosa foi mais pronunciada do que na seqüência dos tumores serosos, o que provavelmente evidencia os dois distintos caminhos de tumorigênese nestes dois tipos histológicos.

A extensa aplicação de novos métodos em histopatologia traz resultados sobre marcadores moleculares em diferentes tipos de tumores humanos. O principal propósito é obter parâmetros adicionais para caracterizar os vários tipos de malignidade, dando maior precisão na informação sobre o comportamento biológico. O Ki67 é um anticorpo, que detecta o antígeno nuclear humano, que está presente na proliferação de células, e é um marcador estabilizador do crescimento tumoral celular. Nos carcinomas ovarianos, a alta expressão do Ki67 tem sido correlacionada com doença avançada e redução na sobrevida (Kritpracha et al., 2005).

Nos tumores ovarianos a ploidia do DNA, que oferece indicações de alterações adquiridas no DNA das células tumorais, tem sido repetidamente demonstrado como o principal fator determinante de sobrevida. As taxas de sobrevida em mulheres com carcinomas diplóide ou próximos a diploidia têm sido melhores, do que naquelas com aneuploidia tumoral (Iversen, 1988; Huettner et al., 1992). Alterações no controle do ciclo celular e da apoptose resultam em maior número de células em proliferação, sendo que a proporção de células neste estado é um importante marcador de gravidade das neoplasias. A quantidade de células em estado proliferativo pode ser indiretamente mediada através da detecção de um antígeno nuclear expresso no final da fase G1, toda a fase S e início de G2, chamado Ki67. Estudos anteriores associaram o crescimento da proporção de células coradas pelo Ki67 à piora da gravidade de diversas neoplasias (Keating et al., 2001; Kruse et al., 2001).

Há controvérsias sobre o potencial de qualificação do Ki67 e da ploidia DNA nos tumores *borderline* (Huettner et al., 1992). O Ki67 foi estudado para diferenciar os tumores *borderline*, dos carcinomas mucinosos em estágio I pela classificação da FIGO, mas não houve diferença estatística, assim como não foi observada diferença entre os tumores benignos e *borderline* em relação ao Ki67. Também não houve significância estatística entre a expressão do Ki67 nos tumores *borderline* serosos e mucinosos, embora evidenciasse uma positividade crescente, em relação ao tamanho do tumor (Darai et al., 1998; Terlikowski et al., 1999). A expressão do Ki67 é um interessante desafio a ser

investigado, pois sugere que o mecanismo de carcinogênese no qual a COX-2 está envolvida não esteja diretamente relacionado com a proliferação (Yoshida et al., 2007). A detecção de neoplasias ovarianas permanece crescente, a distinção entre os tumores benignos, *borderline* e carcinomas é uma importante questão na patogênese ovariana. A limitação dos conhecimentos para procedimentos microscópicos de diagnóstico, e sobre a predição do comportamento do tumor *borderline* nos incentiva a pesquisar sobre o assunto.

Novas perspectivas terapêuticas podem surgir a partir do melhor entendimento sobre a biologia tumoral do ovário. Ainda não se sabe com certeza se a expressão da COX-2 e/ou do Ki67 está presente no cisto de inclusão epitelial superficial, e se estes marcadores podem ser relacionados com a progressão do tumor benigno para maligno. Este estudo avaliou a expressão da COX-2 e Ki67 nas áreas *borderline* nos tumores ovarianos mucinosos, serosos e seromucinosos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar a expressão da COX-2 em tumores *borderline* de ovário, serosos e mucinosos e verificar se essa expressão está relacionada à atividade proliferativa celular, avaliada através a expressão do Ki67, à presença de implantes peritoneais e ao estágio da doença

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a distribuição dos tumores *borderline* serosos, mucinosos e seromucinos segundo a idade, estágio, presença de implantes peritoneais e expressão nuclear do Ki67.
- Avaliar a relação entre a expressão da COX-2 e o tipo histológico seroso, mucinoso ou seromucinoso, a expressão do Ki67, estágio e presença de implantes peritoneais.

3. Publicação

Title: The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) is higher in serous compared to mucinous borderline ovarian tumors and correlates with cell proliferation activity

Corresponding Author: Dr Sophie Derchain

Authors: Patricia Patury; Adriana Yoshida; Priscila Marshall; Liliana A Andrade; Paula Faria; Fabio Carvalho; Sophie Derchain

Dear Dr Derchain,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Gynecologic Oncology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Gynecologic Oncology as an

author: <http://ees.elsevier.com/ygyno/>

Your username is: XXX

Your password is: XXX

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Gynecologic Oncology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Meghan Riley

Gynecologic Oncology, Editorial-Production Office Elsevier

525 B Street, Suite 1900

San Diego, CA 92101-4495 USA

Phone: (619) 699-6753

Fax: (619) 699-6859

E-mail: gyn@elsevier.com

Our new self-help site at <http://epsupport.elsevier.com/> describes a range of EES topics, answers frequently asked questions, and provides interactive EES tutorials for authors, editors and reviewers.

The expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) is higher in serous compared to mucinous borderline ovarian tumors and correlates with cell proliferation activity

Patricia Patury¹

Luís Otávio Sarian²

Adriana Yoshida²

Priscila Marshall²

Liliana A. L. A. Andrade³

Paulo Faria⁴

Fábio Carvalho⁴

Sophie F. M. Derchain²

1. Department of Gynecology Oncology, Instituto Nacional de Câncer- INCA, Rio de Janeiro, Brazil

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Campinas State University, São Paulo, Brazil

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

4. Department of Pathology, Instituto Nacional de Câncer- INCA, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author:

Sophie F. M. Derchain, MD, PhD

Rua Antônio Hossri, 629 – Cidade Universitária

13083-370 – Campinas – SP, Brazil.

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

E-mail: derchain@supernet.com.br

Abstract:

Objective: To assess whether the expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in borderline ovarian tumors is related to tumor type, cell proliferation rate, presence of peritoneal implants or disease stage. *Methods:* The study included 86 borderline epithelial tumors of the ovary; 36 serous, 46 mucinous and 4 seromucinous (endocervical-type mucinous), obtained from women who underwent surgery between January 1998 and December 2004. Expression of COX-2 and Ki67 proteins were evaluated with immunohistochemistry, in paraffin-embedded sections of the ovarian tumors. *Results:* Most women had stage I disease, although a higher proportion of advanced disease was found in women with serous (14.7%) or seromucinous (50%) neoplasia ($p=0.001$). Thirteen women were found to harbor peritoneal implants. The proportion of cells with positive nuclei for Ki67 was significantly higher in mucinous tumors ($p=0.014$). Serous tumors presented a higher expression of COX-2 compared to mucinous ones (68.5% versus 52.5%; $p<0.01$). Tumors with $\geq 15\%$ of nuclei positive for Ki67 also had a higher expression of COX-2. The higher expression of COX-2 did not correlate with peritoneal implants and disease stage. *Conclusion:* These results indicate that the expression of COX-2 is positively related to the cell proliferation rate and was higher in serous than in mucinous borderline ovarian tumors. However, the study design prevents the assessment of whether COX-2 is itself a modulator of the tumor's behavior or a surrogate marker of the biological events that lead to increased aggressiveness.

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

Introduction

Ovarian carcinoma constitutes several disease entities [1]. The examples range from low- to high- grade serous carcinomas [2,3], encompassing a distinctive class of low malignant potential (hereinafter treated as borderline tumors) neoplasia. Borderline tumors generally share a relatively indolent behavior, with an overall 5-year survival of 95%. However, several factors have been found to correlate with a poorer prognosis and/or further development of frankly malignant disease, e.g. mucinous type, cell proliferation rate and the detection of peritoneal implants during surgical staging [4-6]. Unfortunately, even though the morphological classification of borderline tumors is familiar to most pathologists, the lack of predictability regarding the biological behavior of these tumors makes its clinical management a source of concern between gynecologic oncologists.

It is accepted today that there should exist two biological pathways that lead to the formation of ovarian neoplasia. One pathway, more commonly related to serous tumors, consists of the rapid transition from the normal ovarian surface epithelium to ovarian intraepithelial neoplasia and, finally, high-grade ovarian cancer. The other pathway consists of the transition from benign serous or mucinous cystadenomas to low-grade ovarian carcinoma, and in most cases includes a transitory phase during which the tumor should be categorized as borderline. It is also believed that serous borderline tumors (SBTs) are rarely associated with invasive serous carcinoma. However, SBTs sometimes progress to carcinoma, and therefore some relationship must exist. In contrast, mucinous borderline tumors (MBTs) are more often associated with invasive mucinous carcinoma. These disparate findings suggest that some borderline tumors are precursors of invasive carcinoma, and others are not. Several studies tried to elucidate

the relationship between borderline ovarian tumors and invasive cancer, by even proposing elegant models of tumor development [7-10], based on the presumption that each tumor type has a different underlying pathogenesis and natural behavior.

Studies on the molecular biology of ovarian tumors, however, are incrementally yielding new tools that, in the near future, may help distinguish the borderline ovarian tumors with increased hazardous potential from those with a more indolent behavior [7,10]. One of the most promising molecules that may furnish clinically relevant information is cyclooxygenase-2 (COX-2), the rate-limiting enzyme in the conversion of arachidonic acid to prostanoids. COX-2 is inducible by a variety of *stimuli* and is involved in inflammatory reactions and pathological processes [11]. Recent studies suggest that over-expression of COX-2 is related to carcinogenesis by increasing the cell proliferation activity, promoting neoangiogenesis and reducing apoptosis in human tumors [12,13]. To date, however, there is a lack of evidence on how this enzyme could be used a marker of the biological behavior of borderline ovarian tumors, most likely because of the scarcity of large series of specimens available for study.

A lower expression of COX-2 may be related to the development of borderline ovarian tumors, whereas a higher expression of this enzyme is most prominently found in ovarian carcinomas [14,15]. In a previous study on benign, borderline and malignant tumors, we detected a positive trend in COX-2 expression, accompanying the adenoma-carcinoma sequence, in either serous or mucinous ovarian tumors [15]. Taking advantage of the large amounts of stored material from two Brazilian gynecologic oncology reference centers, we decided to further examine the behavior of the COX-2 enzyme in ovarian neoplasms. We therefore designed the present study, which examines the expression of COX-2 in different types of borderline ovarian tumors, and

concurrently evaluates the cell proliferation activity (expression of nuclear Ki67) and clinical features of the disease: stage and presence of peritoneal implants. The present results may contribute to the understanding of the role played by COX-2 in ovarian pathogenesis.

Subjects and methods

Selection of the patients: For this multi-center study, surgical specimens of borderline epithelial ovarian tumors were identified from women who underwent laparotomy between January 1998 and December 2004 at the Division of Gynecologic Oncology, Department of Obstetrics and Gynecology, Campinas State University; and at the Department of Gynecologic Oncology in the National Institute of Cancer (INCA) in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical data from the patients' files were retrieved: age at diagnosis, disease stage, and presence of peritoneal implants. Patients were excluded if: a) were pregnant at the moment of the diagnosis or b) had other synchronic or asynchronic malignant tumors. Two experienced pathologists, who rendered a final pathological diagnosis, reviewed the paraffin sections retrieved from the archives: 36 serous borderline tumors, 46 mucinous borderline tumors and 4 seromucinous borderline tumors. Local ethics committees of both institutes approved the study protocol. Because of the retrospective nature of the study, the researchers were granted exemption from obtaining the signed informed consent from the patients.

Immunohistochemistry (IHC)

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

COX-2 protein expression: COX-2 immunoreactivity grading was based on the staining intensity and on the proportion of cells displaying the enzyme. The enzyme expression was analyzed first on a subjective evaluation of the intensity of cytoplasmatic staining, and scored from 0 to 3: 0=negative, 1=weak, 2=moderate and 3=strong. This

evaluation was performed by two pathologists and, in case of disagreement, the slide was submitted to a revision in a co-observer microscope and a consent diagnosis was rendered. The value of weighted $kappa=0.81$ points towards a very good level of agreement between these two professionals. Subsequently, positive and negative cells were counted, with no less than 500 cells as the minimum acceptable count number in five high power fields (400X). The staining intensity and the percentage of cells expressing COX-2 in their cytoplasm were multiplied, rendering a score with theoretical range of 0 to 3, hereinafter named as *COX-2 integrated score* for clarity.

Ki67 nuclear expression: Lesions were allotted to two distinct groups on the basis of their Ki67 nuclear expression: 1) those with totally negative expression of the marker and 2) those with varying percentages of cells expressing Ki67. The percentage of stained nuclei was used for the assessment of cell proliferation, with a mandatory minimum count of 500 nuclei in five fields. The median count of stained nuclei was 15%. For statistical purposes, two groups were thereby formed: 1) less than 15%, 2) 15% or above

Statistical Analysis: Data were stored in OpenOffice spreadsheets. The Kruskal-Wallis test was used to compare, across the histological strata (serous, mucinous and seromucinous) 1) the mean age of the patients; 2) the mean percentage of Ki67 positive nuclei. Chi-squares were calculated to compare the proportions clinical staging, peritoneal implants, cases with $\geq 15\%$ positive nuclei across the histological strata. In order to proceed with the multivariate analysis, the Fligner-Killeen test for homogeneity of variances for the proportions of COX-2 positive cells and COX-2 integrated scores across the histological strata. Then, a multi-way (multivariate) analysis of variance was used to compare the a) mean percentages of cells expressing COX and the mean COX-2 integrated scores across the histological types,

Ki67 expression categories, in women with and without peritoneal implants, and across disease stages. The statistical analyses were performed using R Environment [16] statistical software package, with significance levels at 5% (two-tail).

Results

Table 1 illustrates the key features of the patients and their ovarian borderline tumors. Mean age of the patients did not differ between women with borderline mucinous, serous or seromucinous tumors ($p=0.62$). Most women had stage I tumors, although a higher proportion of advanced disease was found in women with serous (14.7%) or seromucinous (50%) neoplasia ($p=0.001$). Thirteen women were found to harbor peritoneal implants, and 3 of these women belonged to the restrict group of women with seromucinous tumors ($p=0.001$). The proportion of cases with $\geq 15\%$ nuclei stained for Ki67 was higher in mucinous tumors (65.2%) compared to their serous (25%) and seromucinous (25%) counterparts ($p<0.001$).

Table 2 displays the multivariate analysis concerning the % of cells with COX-2 stained cytoplasm and the COX-2 integrated score. Serous tumors presented a higher proportion of stained cytoplasm compared to mucinous ones (68.5% versus 52.5%; $p<0.01$), and the COX-2 integrated scores for these tumors were also higher ($p<0.01$). The two-by-two comparisons between histological types revealed that the cytoplasm staining for COX-2 the contrasts of seromucinous versus mucinous and of seromucinous versus serous tumors were not statistically significant (data not shown). Tumors with $\geq 15\%$ of nuclei positive for Ki67 also had a higher expression of COX-2 ($p=0.03$) and COX-2 integrated scores ($p=0.04$). COX-2 expression did not correlate with peritoneal implants and disease stage.

Discussion

The present study illustrates that serous borderline ovarian tumors display a significantly higher expression of cytoplasmic COX-2 compared to their mucinous counterparts. By contrast, the study also revealed a higher mitotic activity, or cell proliferation rate, (expression of Ki67) in mucinous tumors. The relatively small proportion of seromucinous tumors precluded further analysis concerning this uncommon subtype of ovarian epithelial tumors.

This study yielded important information concerning the biological activity of borderline tumors, allowing a better understanding of the developmental processes that lead to ovarian carcinogenesis. The increased expression of COX-2 in borderline ovarian tumors as contrasted to mucinous borderline tumors reveals that the inflammatory pathway plays a role in the carcinogenic process, and that this role is substantially different in serous and mucinous tumors. Previous reports pointed out to a higher expression of COX-2 in serous compared to mucinous ovarian tumors, but these analysis never encompassed a such large number of borderline tumors [15,17].

It has long been proposed that tumor promoters may substantially induce the expression of COX-2. This enzyme, by its turn, may ultimately stimulate the epidermal growth factor receptor, hence favoring cell proliferation [18, 19]. This *in vitro* finding provides an excellent explanation for the different clinical behaviors of mucinous and serous malignant ovarian tumors, notably the increased aggressiveness of the later compared to the former. In those studies, the expression of COX-2 in serous tumors was substantially higher than that in mucinous malignant tumors, as was the proportion of women with advanced disease [20]. It has been almost unequivocally demonstrated that

mucinous invasive tumors share a more indolent behavior as compared to serous tumors, resulting in better prognosis and survival. Whether these differences might be ascribed to mechanisms involving the expression of COX-2, it is still too premature to conclude. Nevertheless, there seems to exist a clear relationship between the expression of the enzyme and the clinical behavior of the neoplasia, at least considering the group formed by invasive tumors. The expression of COX-2 is also significantly higher in borderline serous tumors compared to their mucinous counterparts, as the present study clearly demonstrates.

Some authors have already anticipated that COX-2 inhibitors may, in the near future, become prescription drugs in the treatment of ovarian tumors [21,22]. The present study, however, brings information that complicates the already complex and incomplete understanding of the role played by COX-2 in the carcinogenic processes relating to ovarian tumors. Our previous reports have suggested that there might exist an upward trend in COX-2 expression comparing benign to borderline, and borderline to frankly invasive tumors, regardless of the histological line (serous or mucinous) lineage to which these neoplasms belong [15]. The present study points toward another rationale, by which the expression of COX-2 is much higher in serous tumors as compared to mucinous ones. It is still impossible, highly unfortunately, to draw any conclusions as to whether the increased expression of COX-2 is a cause of the higher aggressiveness of serous tumors or it is just a biological characteristic of this group of tumors. Although unproven, it seems to exist an association between a worse clinical behavior of the tumor and the increased expression of COX-2, but this relation is clear only in malignant tumors [20].

In the present study, there was a marked association between the COX-2 expression and the proliferative activity (expression of Ki67). This finding is interesting because the multivariate analysis excluded the effect of the tumor type (the analysis had shown that the expression of Ki67 was higher in mucinous tumors) on the proliferation cell rate. In one previous report on malignant tumors, the Ki67 staining was found to be lower in mucinous tumors compared to serous malignancies. This finding should not be extrapolated to borderline tumors, as demonstrated by the present study, which is empowered by the relatively high number of mucinous tumors. The significant correlation between COX-2 and Ki67, adjusted for the tumor type, strongly suggests that the proliferative activity is related to COX-2 activity, regardless of the tumors type. Previous reports failed to reach this same conclusion, probably because of the rarity of mucinous tumors. It is also sensible to infer that borderline tumors are theoretically very adequate for the studies on the variability of the cell proliferation rate, because malignant tumors have an already increased cell proliferation rate, which may offset a minor variability that might exist between tumor types. By contrast, ovarian adenomas have a very weak Ki67 immunostaining pattern [15].

Recent epidemiological lines of evidence may help understand the relation between the expression of COX-2 and the cellular proliferative activity. Vadlamudi et al. [23] and others reported on the coexpression of COX-2 and HER2/HER3, which are potent epidermal growth factors. Erkinheimo et al. [24] described an association between HER2 amplification and COX-2 expression, although Ferrandina et al. [12] have heavily contested this finding. The difficulties in interpreting these contradictory findings relies on the fact that COX-2 is expressed in a limited number of tumor cell

types, although the enzyme has been proved to be inducible by tumor promoters, cytokines and growth factors. It is still unclear, however, whether COX-2 is just a marker of the disrupted cell proliferation control mechanisms or is itself an inducer of cell proliferation or even dedifferentiation.

The present report brings information that helps explain the biological events that lead to tumor formation in the epithelium of the ovaries. Two important assumptions are corroborated by the present findings: 1) serous borderline tumors display an increased expression of COX-2 as compared to mucinous borderline tumors, as do their malignant counterparts and 2) there was a marked relation between cell proliferation activity (Ki67 expression) and COX-2, even after adjusting for the tumor type. The interpretation of these findings is difficult, however. Whereas the relation between the increased cell proliferation activity and higher COX-2 expression in serous malignant tumors is compatible with the more aggressive clinical behavior of this tumor type, the higher expression of COX-2 in borderline serous tumors than in mucinous ones not explain the higher likelihood of further development of malignant disease typical of the mucinous borderline tumors.

The current evidence, to which the present findings are an addition, indicates that the expression of COX-2 and the cell proliferation rate in ovarian tumors are linked. This relationship may have potential clinical implications while considering frankly malignant neoplasia. However, considering borderline tumors, although this same relation could have been demonstrated, it might be unimportant from the clinical standpoint. In this group of tumors, regardless of the potential effects played by COX-2,

mucinous tumors have a significantly higher cell proliferation rate and a worse prognosis.

Acknowledgments

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

References

1. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol*, 2008;27: 161-174.
2. Singer G, Kurman RJ, Chang H W, Cho SK, et al.- Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol*, 2002; 160:1223-1228.
3. Singer G, Stohr R, Cope L, et al. Patterns of P53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high- grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutation analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Patol* 2005;29: 218-24.
4. Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, et al. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* 2005;11:63-70.
5. Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor- 1 beta (HNF- 1 beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol* 2006;19:83-9.
6. Korner M, Burckhardt E, Mazzucchelli L. Higher frequency of chromosomal aberrations in ovarian endometriosis compared to extragonadal endometriosis: a possible link to endometrioid adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:1615-23.
7. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis- a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004; 164:1511-1518.

8. Shih I-M, Kurman RJ. Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges. *Clin Cancer Res*. 2005;11: 7273-7279.
9. Gershenson DM, Sun CC, Lu KH, et al. Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obst Gynecol* 2006;108:361-8.
10. McCluggage WG. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *J Clin Pathol*, 61:152-163, 2008.
11. Doré M, Côté LC, Mitchell A, Sirois J. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem* 1998;46:77-84.
12. Ferrandina G, Raneletti FO, Lauriola L *et al*. Cyclooxygenase-2 (COX-2), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002;85:305-10.
13. Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Jahan I, Alam SM, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2006;15:21-5.
14. Dursun P, Gultekin M, Yuce K, Ayhan A. Lower expression of cyclooxygenase-2: is it associated with development of borderline ovarian tumors? *Med Hypotheses* 2005;64:273-8.

15. Yoshida A, Sarian LO, Andrade LA, Pignataro F, Pinto GA, Derchain SFM. Cell proliferation activity unrelated to COX-2 expression in ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17,607-614.
16. R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>.
17. Li M, Qi SY, Wang Y, Feng SX, Zhang BZ, Wang R. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and Bcl-2 in borderline ovarian tumors. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 272:48-52.
18. Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenase 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1438:120-30.
19. Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L *et al*. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;94:657-62.
20. Athanassiadou P, Grapsa D, Athanassiades P, Gonidi M, Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E. The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. *Pathol Res Pract*. 2008;204(4):241-9.

21. Li W, Zhang HH, Xu RJ, Zhuo GC, Hu YQ, Li J. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, on the growth of ovarian carcinoma in vivo. *Med Oncol*. 2008;25(2):172-7.
22. Xin B, Yokoyama Y, Shigeto T, Mizunuma H. Anti-tumor effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human ovarian cancers. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(4):365-9.
23. Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelson J, Kumar R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene* 1999;18:305-14.
24. Erkinheimo TL, Lassus H, Finne P et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with altered expression of p53 and SMAD4, amplification of HER-2/neu, and poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:538-45.

Article précis: The expression of COX-2 in borderline ovarian tumors is higher in serous neoplasia and bears a relation with cell proliferation rate.

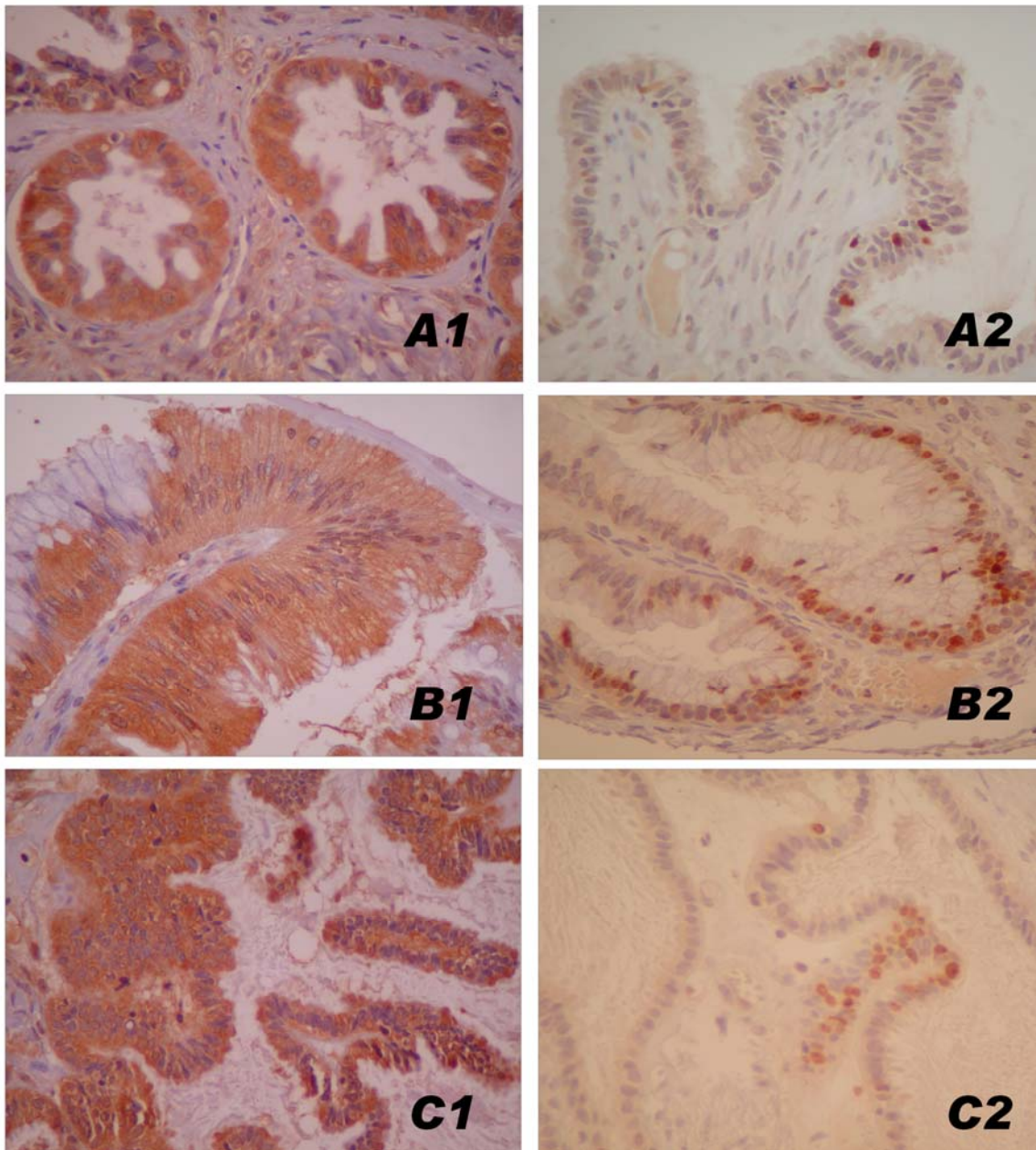
Table 1 – Histopathological and clinical features of the cases

	<i>Total</i> <i>N=86</i>	<i>Serous</i> <i>N= 36</i>	<i>Mucinous</i> <i>N= 46</i>	<i>Sero- mucinous</i> <i>N= 4</i>	<i>P</i> <i>value</i>
Mean age (sd)	42.4 (16.5)	40.1 (16.5)	44.2 (17.1)	40.2 (7.0)	0.62
<i>Stage*</i>					
Ia	54 (64.3%)	17 (50%)	37 (80.4%)	0	
Ib	7 (8.3%)	5 (14.7%)	2 (4.3%)	0	
Ic	11 (13.1%)	6 (17.6%)	4 (8.7%)	1 (25%)	
II	2 (2.8%)	1 (2.9%)	0	1 (25%)	
III	10 (11.9%)	5 (14.7%)	3 (6.5%)	2 (50%)	0.001
<i>Peritoneal implants*</i>					
Yes	13 (15.5%)	7 (20.6%)	3 (6.5%)	3 (75%)	
No	71 (74.5%)	27 (79.4%)	43 (93.5%)	3 (25%)	<0.001
<i>Ki67</i>					
<15%	46 (53.5%)	27 (75%)	16 (34.8%)	3 (75%)	
>=15%	40 (46.5%)	9 (25%)	30 (65.2%)	1 (25%)	<0.001

*Two cases ignored

Table 2 – Multivariate analysis of the expression of COX-2 in ovarian borderline tumors

	<i>Mean percentage of cells expressing COX-2</i>	<i>P value</i>	<i>COX-2 integrated score (range 0-3)</i>	<i>P value</i>
<i>Histological type</i>				
Mucinous	52.5 (25.7)	Ref.	1.2 (0.8)	Ref.
Seromucinous	66.5 (33.7)	0.13	1.6 (0.9)	0.12
Serous	68.5 (22.2)	<0.01	1.7 (0.8)	<0.01
<i>Ki 67</i>				
<15%	58.7 (26.8)	Ref	1.4 (0.8)	Ref
>=15%	61.1 (26.8)	0.04	1.5 (0.9)	0.03
<i>Peritoneal implants</i>				
No	58.4 (25.6)	Ref	1.4 (0.8)	Ref
Yes	68.4 (25.3)	0.53	1.7 (0.9)	0.33
<i>Stage</i>				
I	58.4 (25.5)	Ref	1.4 (0.8)	Ref
II	35.0 (12.7)	0.61	0.6 (0.4)	0.79
III	75.7 (22.7)	0.29	1.9 (0.7)	0.19
Ref = referential				



Legend to figure 1: positive COX-2 and Ki67 expression in different borderline tumors (original magnification 400X): COX-2 expression in: A1) serous borderline B1) mucinous borderline C1) serousmucinous borderline. Ki 67expression in: A2) serous borderline B2) mucinous borderline C2) serousmucinous borderline.

4. Conclusões

- A idade média das mulheres estudadas foi de 40 anos (mínima e máxima), não havendo diferença significativa entre aquelas com tumores serosos, mucinosos ou seromucinosos. A maioria das mulheres apresentavam doença em estágio I, embora a presença de implantes peritoneais tenha sido observada em 13 casos, sendo significativamente maior em mulheres com tumores seromucinosos. A expressão nuclear do Ki67 foi maior nos tumores mucinosos, em comparação com os serosos e seromucinosos.
- A expressão citoplasmática da COX-2 foi significativamente maior nos tumores serosos. A maior expressão da COX-2 esteve significativamente associada com uma maior expressão do Ki67 em todos os tipos histológicos. Por outro lado, a expressão da COX-2 não se relacionou com o estágio da doença nem com a presença de implantes peritoneais.

5. Referências Bibliográficas

Allison KH, Swisher EM, Kerkering KM, Garcia RL. Defining an appropriate for the diagnosis of serous borderline tumor of the ovary: when is a full staging procedure unnecessary ? *Int J Gynecol Pathol* 2007; 27: 10-17.

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

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2008. Atlanta, GA: **American Cancer Society** [online] 2008 [acessado em 20 mar 2008].
Disponível em:URL. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2005f4PWSecured.pdf>

Athanassiadou P, Grapsa D, Athanassiades P, Gonidi M, Athanassiadou AM, Tshipis A et al., The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. *Pathol Res Pract.* 2008;204(4):241-9.

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

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

Ayhan A, Guven ESG, Guven S, Kucukali T. Reccurrence and prognostic factors in borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2005; 98 439-45.

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

Bell DA, Scully RE. Ovarian serous borderline tumors with stromal micorinvasion: a report of 21 cases. ***Hum Pathol***. 1990; 21:397-403.

Bell DA, Scully RE. Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. ***Cancer*** 1994, 114;73:1859-64.

Bell DA, Longacre TA, Prat J, Kohn EC, Soslow RA, Ellenson LH, Malpica A, et al. Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives. ***Hum Pathol*** 2004; 35:934-48.

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

Brewer M A, Johnson K, Follen M, Gersheson D, Bast RJ - Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. ***Clin Cancer Res*** 2003; 9:20-30.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. ***Genome Biol*** 2004; 5:241-7.

Chapman WB. Developments in the pathology of ovarian tumours. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2001 Feb;13(1):53-9.

Chen S, Leitaó MM, Tornos C, Soslow RA. Invasion patterns in stage I endometrioid and mucinous ovarian carcinomas: a clinicopathologic analysis emphasizing favorable outcomes in carcinomas without destructive stromal invasion and the occasional malignant course of carcinomas with limited destructive stromal invasion. ***Mod Pathol*** 2005;18: 903-11.

Choe MS, Zhang X, Shin HJ, Shin DM, Chen ZG. Interaction between epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 mediated pathways

and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer. ***Mol Cancer Ther*** 2005; 4:1448-55.

Colombo K, Chiari S, Maggioni A, Bocciolone L, Torri V, Mangioni C. Controversial issues in the management of early epithelial ovarian cancer: conservative surgery and role of adjuvant therapy. ***Gynecol Oncol*** 1994; 55:547-51.

Cramer DW, Harlow BL, Titus-Ernstoff L, Bohlke K, Welch WR, Greenberg ER. Over-the-counter analgesic and risk of ovarian cancer. ***Lancet*** 1998; 351:104-7.

Darai E, Combrouze FW, Geoffroy MC, Vincente Y, Feldman G, Madelena T P et al. Ki67 expression in 35 borderline ovarian tumours: relations with clinicopathologic parameters and ploidy. ***Eur J Obst Gynecol Repr Biol*** 1998; 76:175-180.

Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih I-M. The development of high- grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. ***Am J Surg Pathol*** 2007; 31:1007-12.

Denker TC, Kobel M, Pest S, Kochi I, Berger S, Schwabe M, et al. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. ***Am J Pathol*** 2002; 160:893-903.

Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, Shafer SA, Crowley D, Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. ***Nat Med*** 2005 11(1):63-70.

- Doré M, Côté LC, Mitchell A, Sirois J. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. **J Histochem Cytochem** 1998 ; 46:77-84.
- Dursun P, Gultekin M, Yuce K, Ayhan A. Lower expression of cyclooxygenase-2: is it associated with development of borderline ovarian tumors? **Med Hypotheses** 2005; 64:273-8.
- Ferrandina G, Raneletti FO, Lauriola L, Fanfani F, Legge F, Mattolese M, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and Her-2/neu expression in ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2002; 85:305-10.
- Ferrandina G, Zannoni GF, Ranelletti FO, Legge F, Gessi M, Salutari V, et al. Cyclooxygenase-2 expression in borderline in ovarian tumors. **Gynecol Oncol** 2004; 95:46-51.
- Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Jahan I, Alam SM, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in ovarian cancer. **Oncol Rep** 2006; 15:21-5.
- Gallicchio L, McSorley MA, Newschaffer CJ, Thuita LW, Huang HY, Hoffman SC et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. **Cancer** 2006; 106: 1443-52
- Gershenson DM. Is micropapillary serous carcinoma for real? **Cancer** 2002; 95:677- 80.
- Ho CL, Kurman RJ, Dehari R, Wang TL, Shih IM. Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. **Cancer Res** 2004; 64:6915–8.

Huettner PC, Weinberg DS, Lage JM. Assessment of proliferative activity in ovarian neoplasm by flow and static cytometry. Correlation with prognostic features. **Am J Pathol** 1992; 141:699-706.

Iversen O E. Prognostic value of the flow cytometric DNA index in human ovarian carcinoma. **Cancer** 1988; 61:971-5.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** 2007;57:43-66.

Kato N, Sasou S, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor- 1 beta (HNF- 1 beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. **Mod Pathol** 2006;19:83-9.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. **Am J Surg Pathol** 2001; 25:884-91.

Korner M, Burckhardt E, Mazzucchelli L. Higher frequency of chromosomal aberrations in ovarian endometriosis compared to extragonadal endometriosis: a possible link to endometrioid adenocarcinoma. **Mod Pathol** 2006;19:1615-23.

Kottmeier HL. The classification and treatment of ovarian tumors. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1952; 31:313-63.

Kottmeier H L, Kolstad P, Mc Garrity KA. Annual report on results of treatment in gynecologic cancer. Stockholm: **Radiumhemmet Editorial Office**, 1973;7.

Kritpracha K, Hanprasertpong J, Chandeying V, Dechsukhum C, Geater A. A survival analysis in advanced epithelial ovarian carcinoma in relation to

proliferative index of MIB-1 immunostaining. **J Obstet Gynaecol Res** 2005; 31:268-76.

Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boodt PJ, et al. The HS .Ki67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. **J Pathol** 2001; 193:48-54.

Kurman RJ, Seidman JD, Shih IM. Serous borderline tumours of the ovary. **Histopathology** 2005; 47: 310-15.

Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. **Int J Gynecol Pathol** 2008; 27:151-60.

Leitao MM, Boyd J, Hummer A, Olvera N, Arroyo CD, Venkatraman E, et al. Clinicopathologic analysis of early stage sporadic ovarian carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:147-59.

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

Link CJ, Reed E, Sarosy G, Kohn EC. Borderline ovarian tumors. **Am J Med** 1996; 101:217-25.

Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Lee R, Holland JF, Levine AC. Inhibition of cyclooxygenase 2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. **J Urol.** 2000;164:820-5

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

Marnett LJ. Aspirin and the potencial role of prostaglandins in colon cancer. **Cancer Res** 1992; 52:5575-89.

Matsumoto Y, Ishiko O, Deguchi M, Nakagawa E, Ogita S. Cyclooxygenase 2 expression in normal ovaries and epithelial ovarian neoplasm. **Int J Mol Med** 2001; 8:31-6.

McCluggage WG. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. **J Clin Pathol** 2008; 61:152-63.

O'Neill CJ, Deavers MT, Malpica A, Foster H, McCluggage WG. An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, bcl2, her-2/neu and C-KIT in high-grade neoplasms. **Am J Surg Pathol** 2005;29:1034–41.

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

Powell D, Puls L, Van Nagell. Current concepts in epithelial tumours: Does benign to malignant transformation occur? **Human Pathol** 1992; 23:846-7.

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

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

Ronnett BM, Kajdacsy-Balla A, Gilks CB, Merino MJ, Silva E, Werness BA, Young RH. Mucinous borderline ovarian tumors: points of general agreement and persistent controversies regarding nomenclature, diagnostic criteria, and behavior. ***Hum Pathol*** 2004;35:959–60.

Ronnett BM, Shmookler BM, Diener-West M, Sugarbaker PH, Kurman RJ. Immunohistochemical evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women. ***Int J Gynecol Pathol*** 1997;16:1–9.

Rosemberg L, Palmer JR, Rao RS, Coogan PF, Strom BL, Zauber AC, Stolley PD, Shapiro S. A case-control study of analgesic use and ovarian cancer. ***Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*** 2000; 9:933-7.

Rozic JG, Chakraborty C, Laal PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. ***Int J Cancer*** 2001; 93:497-506.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, De Angelo LAA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. ***Gynecol Oncol*** 2006; 3:537-41.

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

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

Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian Serous Borderline Tumors: A critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. ***Hum Pathol*** 2000; 31: 539- 57.

Seidman JD, Kurman RJ, Ronnet BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:985-93.

Seidman JD, Soslow RA, Vang R, Bermann JJ, Stoler MH, Sherman ME, et al. Borderline ovarian tumors: diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images. *Hum Pathol* 2004; 35:918-33.

Serov SF, Scully RE, Sobin LH. International histological classification and staging of tumors: no. 9. *In: Histologic Typing of Ovarian Tumors*. Geneva: **World Health Organization**, 1973

Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164:1511-18

Shih IM, Kurman RJ. Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7273-79.

Sieben NL, Macropoulos P, Roemen GM, Kolkman-Uljee SM, Jan Fleuren G, Houmadi R, et al. In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutation are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* 2004; 202:336–40.

Silverberg SG, Bell DA, Kurman R J, Seidman J D, Prat J, Ronnet B M et al. Borderline ovarian tumors: key points and workshop summary. *Human Pathol* 2004; 8:910-17.

Singer G, Kurman RJ, Chang H W, Cho SK, Shi IM. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160:1223-28.

Singer G, Stör R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, et al. Patterns of P53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis : a mutation analysis with immunohistochemical correlation. ***Am J Patol*** 2005; 29:218-24.

Sinicrope FA, Gills S. Role of cyclooxygenase 2 in colorectal. ***Cancer Metastasis Rev*** 2004; 23:63-75.

Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. ***Int J Gynecol Pathol*** 2008; 27:161-74.

Tavassoli FA, Devilee P. Surface epithelial-stromal tumors. Tumors of the breast female genital organs - Pathology and Genetics. ***World and Health Organization Classification of Tumours***. Lyon, France, 2003 p.117-145.

Taylor HC. Malignant and semi- malignant tumors of the ovary. ***Surg Gynecol Obstet*** 1929; 48:204-30.

Terlikowski S, Sulkowski S, Lenczewski A, Musiatowio B, Kulikowski M. Study of borderline and invasive mucinous ovarian tumors using Ki67 (MIB1) antibodies and nuclear organizer region (NOR) staining. ***Arch Gynecol Obstet*** 1999; 263:29-33.

Trimble CL, Trimble EL. Management of epithelial ovarian tumors of low malignant potencial. ***Gynecol Oncol*** 1994; 55:52- 61.

Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Ronnett BM. Ovarian atypical proliferative (borderline) mucinous tumors: gastrointestinal and seromucinous (endocervical-like) types are immunophenotypically distinctive. ***Int J Gynecol Pathol*** 2006; 25:83-9.

Williams CS, Dubois RN. Prostaglandin endoperoxidase synthase: why two isoforms? ***Am J Physiol*** 1996; 270:393-400.

Wong HF, Low JJH, Chua Y, Busmanis I, Tay EH, Ho TH. Ovarian tumors of borderline malignancy: a review of 247 patients from 1991 to 2004. ***Int J Gynecol Cancer*** 2007; 17:342-49.

Yoshida A, Sarian LO, Andrade LA, Pignataro F, Pinto GA, Derchain SFM. Cell proliferation activity unrelated to COX-2 expression in ovarian tumors. ***Int J Gynecol Cancer*** 2007; 17:607-14

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Ficha de coleta de dados para tumores borderline de ovário

Número do caso: |_|_|_|_|_| Iniciais: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Idade |_|_|_|

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

Reação de imunoistoquímica

Anticorpo	No. biópsia	Ano	Data da reação	Diluição do ac	Controle pos/neg
COX-2					
Ki67 (MIB-1)					

Leitura da coloração:

Avaliação subjetiva da COX-2:

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

Avaliação objetiva da COX-2 :

% das células coradas : _____

Avaliação objetiva do Ki67 : % das células coradas : _____

6.2. Anexo 2: listagem da mulheres incluídas no estudo

Caso	Origem	Ano	Idade	Tipo.histologico	Estadio	Implantes	Ki67	COX-2 por Ferrandina
1	Unicamp	1997	74	mucinoso	I a	nao	0,00	0.24
2	Unicamp	1997	56	seroso	I c	nao	43.33	0.4
3	Unicamp	1997	53	seroso	I a	nao	0,00	2.85
4	Unicamp	1997	15	seroso	I c	nao	0,00	0.47
5	Unicamp	1997	36	mucinoso	I a	nao	2.97	0.5
6	Unicamp	1997	61	mucinoso	I a	nao	39.38	1.76
7	Unicamp	1998	47	seroso	I a	nao	0,00	2,70
8	Unicamp	1998	38	seroso	III c	sim	0,00	1.94
9	Unicamp	1998	21	mucinoso	I a	nao	15.32	0.98
10	Unicamp	1998	58	mucinoso	I a	nao	0,00	0.4
11	Unicamp	1998	35	mucinoso	I a	nao	42.72	1,22
12	Unicamp	1998	25	mucinoso	I a	nao	0,00	0.33
13	Unicamp	1998	48	mucinoso	I a	nao	0,00	1.96
14	Unicamp	1998	40	seroso	I a	nao	22.6	2.64
15	Unicamp	1998	57	seroso	III c	sim	0,00	0.98
16	Unicamp	1998	34	mucinoso	I c	nao	44.27	1.56
17	Unicamp	1999	34	mucinoso	I a	nao	21.6	2,73
18	Unicamp	1999	72	seroso	I a	nao	0.99	2.25
19	Unicamp	1999	30	mucinoso	I a	nao	19.92	0.84
20	Unicamp	1999	18	mucinoso	I a	nao	0,00	0,00
21	Unicamp	1999	42	mucinoso	I a	nao	0,00	1.14
22	Unicamp	1999	26	mucinoso	I b	nao	0,00	2,04
23	Unicamp	2000	77	mucinoso	I a	nao	0,00	1.59
24	Unicamp	2000	22	mucinoso	I a	nao	15,80	2.46
25	Unicamp	2000	16	seroso	I b	nao	6,54	2.58
26	Unicamp	2001	24	mucinoso	I a	nao	39.14	2.94
27	Unicamp	2001	37	mucinoso	III c	sim	4,68	1.72
28	Unicamp	2001	24	mucinoso	I a	nao	48.02	0.54
29	Unicamp	2001	50	mucinoso	I a	nao	32.02	0,00
30	Unicamp	2001	44	mucinoso	I a	nao	0,00	0.26
31	Unicamp	2001	28	seroso	II b	sim	0,00	0.88
32	Unicamp	2001	47	mucinoso	I c	nao	28.14	1.34
33	Unicamp	2002	55	mucinoso	I a	nao	20.09	0.13
34	Unicamp	2002	53	seroso	I c	nao	0,00	0.13
35	Unicamp	2002	24	seroso	I a	nao	0,00	0.72
36	Unicamp	2002	54	seroso	I a	nao	0,00	0.99
37	Unicamp	2002	24	seroso	III c	sim	10.14	2.46
38	Unicamp	2003	60	mucinoso	I a	nao	28.82	0.24
39	Unicamp	2003	24	mucinoso	I a	nao	38.21	1.77
40	Unicamp	2003	23	mucinoso	I a	nao	21.02	0.26
41	Unicamp	2003	58	mucinoso	I a	nao	34.6	0.46
42	Unicamp	2003	39	seroso	I a	nao	4,05	2.37
43	Unicamp	2003	45	seroso	III b	sim	23.80	2.58

Caso	Origem	Ano	Idade	Tipo.histologico	Estadio	Implantes	Ki67	COX-2 por Ferrandina
44	Unicamp	1999	49	seromucinoso	II c	sim	0,00	0.26
46	Inca	2002	19	seroso	Ic	não	7.44	0.99
47	Inca	2002	39	seromucinoso	Ic	não	13.30	1.85
48	Inca	2002	ignorado	seroso	ignorado	não	24.27	0.81
50	Inca	2002	40	seroso	Ic	não	10.05	2.67
51	Inca	2003	76	seroso	Ic	não	12.46	1.13
52	Inca	2003	28	mucinoso	Ia	não	0.71	0.73
53	Inca	2003	34	mucinoso	Ib	não	11.50	0.68
55	Inca	2003	16	seroso	Ib	não	7.32	1.32
56	Inca	2003	43	mucinoso	Ia	não	40.14	2.32
57	Inca	2003	61	mucinoso	Ic	não	21.81	2.31
58	Inca	2003	40	mucinoso	Ia	não	11.04	1.04
59	Inca	2003	70	mucinoso	Ia	não	21.82	0.78
62	Inca	2003	49	seroso	Ib	não	8.30	1,12
63	Inca	2003	77	mucinoso	Ia	não	2.83	1.13
64	Inca	2003	74	seroso	Ia	não	7.68	2.51
65	Inca	2003	47	mucinoso	Ia	não	7.20	0.60
66	Inca	2004	23	seroso	Ia	não	8.04	1.36
68	Inca	2004	23	seroso	IIb	não	23.68	1.25
69	Inca	2004	41	seromucinoso	IIIc	sim	13.29	2.42
70	Inca	2004	52	mucinoso	IIIc	sim	20,00	0.26
72	Inca	2004	44	seroso	Ib	não	22.92	2.91
74	Inca	2004	35	mucinoso	Ia	não	23.59	2.46
75	Inca	2004	33	mucinoso	Ia	não	34.26	1.82
76	Inca	2004	58	mucinoso	Ic	não	11.50	1.04
77	Inca	2004	62	mucinoso	Ia	não	19.37	0.45
78	Inca	2004	49	seroso	Ia	não	18.71	1.40
80	Inca	2004	77	mucinoso	IIIc	sim	25.35	2.65
81	Inca	2003	36	seroso	Ia	não	5.98	0.87
83	Inca	2003	56	mucinoso	Ia	não	59.85	1.88
84	Inca	2004	28	mucinoso	Ia	não	21.30	0.71
86	Inca	2004	28	seroso	Ia	não	24.73	1.94
87	Inca	2003	32	seromucinoso	IIIa	sim	32.33	1.95
88	Inca	2002	43	seroso	Ia	não	21.29	2.67
91	Inca	1998	41	seroso	Ia	não	13.99	1.76
94	Inca	1999	ignorado	seroso	ignorado	não	4.37	2.08
95	Inca	2000	54	seroso	Ia	não	7.79	0.49
96	Inca	2000	38	mucinoso	Ia	não	28.98	1.26
97	Inca	2000	30	seroso	Ia	não	6.90	1.00
98	Inca	2000	34	seroso	IIIa	sim	6.38	1.90
103	Inca	1998	25	seroso	Ia	não	10.88	1.37
105	Inca	1999	70	mucinoso	Ia	não	23.53	1.53
106	Inca	1999	37	mucinoso	Ia	não	31.30	1.98

6.3. Anexo 3. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa das Instituições

6.3.1. Instituto Nacional de Câncer



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

DECLARAÇÃO

Conforme estipulado na Resolução 196 de 10/10/96 do Conselho Nacional de Saúde, MS, declaramos que os resultados do projeto de pesquisa ZD1839/IL0104 intitulado: Expressão da Ciclooxigenase 2 e do Ki 67 nos Tumores Borderline de Ovário, serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Rio de Janeiro, 15 de março de 2005

Dra. Patrícia Patury Borba
Investigadora Principal



TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR E DO CEP

À Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Ref. Termo de Compromisso do Pesquisador e do CEP

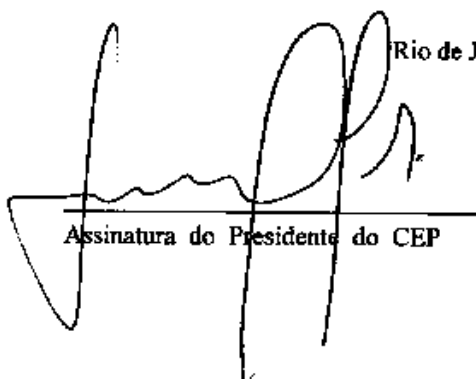
Ref. Prot. nº 05/05 – Expressão da Ciclooxigenase 2 e do Ki 67 nos Tumores Borderline de Ovário

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), devidamente registrado junto a esse Órgão, tendo como Coordenador o Dr. Luis Otávio Olivatto, e a Pesquisadora Principal do estudo citado, Dra. Patrícia Patury Borba, se comprometem a cumprir todas as normas estabelecidas pela Resolução nº 196 de 16 de Outubro de 1996 e de nº 251 de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, relacionada à pesquisa em seres humanos.

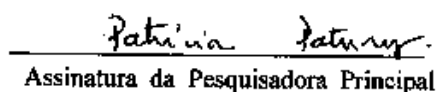
N. Termos,

P. Deferimento.

Rio de Janeiro, 15 de março de 2005.



Assinatura do Presidente do CEP



Assinatura da Pesquisadora Principal



DECLARAÇÃO

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA concorda com as normas de Boas Práticas Clínicas (Good Clinical Practices – GCP/ICH), e atua conforme estas normas.

Rio de Janeiro, 15 de março de 2005

Dr. Luis Otávio Olivatto
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/INCA

6.3.2.

Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (019) 3788-8931

FAX (019) 3788-7181

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

✉ cep@fcm.unicamp.br

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

PARECER PROJETO: Nº 406/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sophie Françoise Mauricette Derchain

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

APRESENTAÇÃO AO CEP: 18/08/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/10/05

II - OBJETIVOS

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

III - SUMÁRIO

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

Os dados serão tratados estatisticamente para finalização do projeto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

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

V - PARECER DO CEP

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

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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

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


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