

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Expressão imuno-histoquímica dos supressores tumorais p53, p16 e p14 em neoplasias epiteliais ovarianas**

**Vinícius Duarte Cabral**

Porto Alegre, 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Expressão imuno-histoquímica dos supressores tumorais p53, p16 e p14 em neoplasias epiteliais ovarianas**

**Vinícius Duarte Cabral**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Maria  
Kliemann

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Cabral, Vinícius Duarte

Expressão imuno-histoquímica dos supressores tumorais p53, p16 e p14 em neoplasias epiteliais ovarianas / Vinícius Duarte Cabral. -- 2016.

99 f.

Orientadora: Lúcia Maria Kliemann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. imuno-histoquímica. 2. p14. 3. p16. 4. p53. 5. ovário. I. Kliemann, Lúcia Maria, orient. II. Título.

*I must not fear.  
Fear is the mind-killer.  
Fear is the little-death that brings total obliteration.  
I will face my fear.  
I will permit it to pass over me and through me.  
And when it has gone past I will turn the inner eye to see its path.  
Where the fear has gone there will be nothing. Only I will remain.*

Litany Against Fear; Dune

**DEDICATÓRIA:**

**À minha mãe, Maria Claudete.**

**À minha avó, Lívia.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Kliemann, por me guiar pelos caminhos do mundo acadêmico e por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava mais.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcelle Cerski, por fazer parte da construção desse projeto, sempre com eficiência e alegria.

À bolsista de iniciação científica Ivana Brito, pela dedicação e excelente trabalho na coleta dos dados.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Prof. Dr. Edison Capp, pelo comprometimento com o rigor científico e pelo apoio na conclusão dessa etapa.

Às arquivistas do Serviço de Patologia do HCPA, Carina e Zeli, pela excelência do trabalho na blocoteca e dedicação ao nosso projeto.

Às pesquisadoras do Serviço de Patologia Experimental do HCPA, Emily e Flávia, pela amizade que temos e pela excelência do trabalho realizado.

À minha família, por sempre me apoiar e estimular minha curiosidade e dever com o trabalho.

Ao Odo, que há três anos permite que eu faça parte da sua existência. Não imagino viver sem essa companhia.

À minha avó, Lívia, que já se foi, mas cujo legado de amor ao trabalho e educação continua vivo através de nós.

À minha mãe. Acho impossível descrever os inúmeros motivos. Por enquanto basta dizer que te amo.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS .....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
INTRODUÇÃO .....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	16
2. Marco conceitual .....	18
3. Epidemiologia.....	19
4. Fatores de risco .....	19
5. Prevenção .....	20
6. Rastreamento.....	20
7. Diagnóstico .....	21
8. Tratamento.....	25
9. Tumores epiteliais ovarianos.....	26
9.1. Tumores serosos .....	26
9.1.1. Tumores serosos benignos .....	26
9.1.2. Tumores serosos borderline/tumores serosos proliferativos atípicos.	27
9.1.3. Tumores serosos borderline – variante micropapilar/carcinomas serosos de baixo grau não invasivos.....	29
9.1.4. Carcinomas serosos de baixo grau .....	30
9.1.5. Carcinomas serosos de alto grau.....	32

9.2. Tumores mucinosos.....	33
9.2.1. Tumores mucinosos benignos.....	33
9.2.2. Tumores mucinosos borderline/tumores mucinosos proliferativos atípicos	34
9.2.3. Carcinomas mucinosos .....	35
9.3. Tumores endometrioides .....	37
9.3.1. Cistos endometrioides/endometriomas .....	37
9.3.2. Tumores endometrioides benignos .....	37
9.3.3. Tumores endometrioides borderline/tumores endometrioides proliferativos atípicos.....	38
9.3.4. Carcinomas endometrioides.....	40
9.4. Tumores de células claras .....	41
9.4.1. Tumores de células claras benignos .....	41
9.4.2. Tumores de células claras borderline/tumores de células claras proliferativos atípicos.....	42
9.4.3. Carcinomas de células claras.....	42
9.5. Tumores de Brenner/transicionais .....	43
9.5.1. Tumores de Brenner.....	43
9.5.2. Tumores de Brenner borderline/tumores de Brenner proliferativos atípicos	44
9.5.3. Tumores de Brenner malignos .....	45
9.6. Tumores seromucinosos.....	46
9.7. Carcinomas indiferenciados.....	46
10. Carcinogênese ovariana .....	46
11. O ciclo celular.....	53
12. Proteínas supressoras tumorais e neoplasias epiteliais ovarianas .....	56
12.1. p53.....	56



12.2. p16.....	58
12.3. p14.....	59
JUSTIFICATIVA .....	61
HIPÓTESES.....	62
OBJETIVOS .....	63
Principais .....	63
Secundários .....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ARTIGO EM INGLÊS .....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	96
PERSPECTIVAS.....	97
ANEXO – Fotos das categorias de expressão imuno-histoquímica .....	98

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- BRCA1: breast cancer 1
- BRCA2: breast cancer 2
- MUTYH: mutY DNA glycosylase
- CA-125: carcinoma antigen 125
- UICC: União Internacional para Controle do Câncer
- FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
- TNM: Classificação TNM de tumores malignos
- T: tumor
- N: linfonodos regionais
- M: metástase a distância
- G1: bem diferenciado
- G2: moderadamente diferenciado
- G3: pouco diferenciado
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- CSAG: carcinoma seroso de alto grau
- CSBG: carcinoma seroso de baixo grau
- NANOG: nanog homeobox
- Epcam: epithelial cell adhesion molecule
- OVGP1: oviductal glycoprotein 1
- p53: tumor protein 53 (proteína)
- PAX8: paired box gene 8
- PTH: papillary tubal hyperplasia

- KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
- BRAF: B-raf proto-oncogene
- ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
- TP53: tumor protein 53 (gene)
- CCNE1: cyclin E1 (gene)
- PTEN: phosphatase and tensin homolog
- SCOUT: secretory cell outgrowth
- STIC: serous tubal intraepithelial carcinoma
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- G0: gap 0
- G1: gap 1
- S: síntese
- G2: gap 2
- M: mitose
- RNA: ácido ribonucleico
- MPF: maturation promotion factor
- cdk: cyclin-dependent kinase
- pRb: retinoblastoma protein
- CKI: cyclin kinase inhibitor
- p16: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (proteína)
- p14: ARF tumor suppressor
- ARF: ARF (alternate reading frame) tumor suppressor
- p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1

- MDM2: mouse double minute 2 homolog
- GADD45: growth arrest and DNA damage
- lincRNA: RNA longo não-codificador intergênico
- miRNA: micro-RNA
- E2F: E2F transcription factor
- CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (gene)
- p15: cyclin-dependent kinase inhibitor B (proteína)
- p18: cyclin-dependent kinase inhibitor C (proteína)
- CIP/KIP: cdk interacting protein/kinase inhibitor protein
- p27: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (proteína)
- p57: cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (proteína)
- HPV: vírus do papiloma humano
- E6: early protein 6
- E7: early protein 7

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia de busca de artigos científicos utilizando o PUBMED. ....	17
Figura 2 - Marco conceitual da dissertação.....	18
Figura 3 - Cistoadenoma seroso .....	27
Figura 4 - Tumor seroso borderline .....	29
Figura 5 - Tumor seroso borderline, variante micropapilar .....	30
Figura 6 - Carcinoma seroso de baixo grau .....	31
Figura 7 - Carcinoma seroso de alto grau .....	33
Figura 8 - Cistoadenoma mucinoso.....	34
Figura 9 - Tumor mucinoso borderline .....	35
Figura 10 - Carcinoma mucinoso .....	36
Figura 11 - Cisto endometriode .....	37
Figura 12 - Adenofibroma endometriode .....	38
Figura 13 - Tumor endometriode borderline .....	39
Figura 14 - Carcinoma endometriode de alto grau/G3 .....	41
Figura 15 - Carcinoma de células claras .....	43
Figura 16 - Tumor de Brenner .....	44
Figura 17 - Tumor de Brenner borderline .....	45
Figura 18 - Tumor de Brenner maligno .....	45
Figura 19 - Teoria da ovulação incessante .....	48
Figura 20 - Teoria da origem tubária .....	52
Figura 21 - Ciclo celular .....	56
Figura 22 - Categoria 0 (0% de núcleos positivos).....	98
Figura 23 - Categoria 1 (1-10% de núcleos positivos).....	98
Figura 24 - Categoria 2 (11-50%) de núcleos positivos.....	99
Figura 25 - Categoria 3 (51-100%) de núcleos positivos.....	99

## RESUMO

**Introdução:** Anormalidades nos supressores tumorais p14, p16 e p53 são relatadas em diversos tipos de câncer em humanos. Na carcinogênese ovariana, p16 e p53 foram extensivamente estudados, mas p14 foi analisado somente em carcinomas. **Objetivo:** O estudo visa determinar a expressão imuno-histoquímica de p14, p16 e p53 em tumores ovarianos epiteliais benignos, borderline e malignos. **Método:** Estudo transversal utilizando imuno-histoquímica em amostras de tumores epiteliais ovarianos emblocados em parafina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Resultados:** p14 foi positivo em 93% dos tumores benignos, 94% dos borderline e 60% dos malignos. A perda de expressão foi estatisticamente associada com carcinomas. p16 foi positivo em 94,6% dos carcinomas, 75% dos tumores borderline e 45,7% dos benignos. p53 foi positivo em 29,7%, 16,7% e 2,9% dos tumores malignos, borderline e benignos, respectivamente. Os subtipos de carcinoma não mostraram diferenças de expressão. **Conclusão:** Nosso estudo foi o primeiro a descrever a expressão de p14 em tumores benignos e borderline. Ela permanece estável nos benignos e borderline, enquanto os carcinomas exibem uma perda de expressão significativa. Isso pode indicar que anormalidades de p14 acontecem tardiamente na carcinogênese. As taxas de expressão de p16 e p53 foram semelhantes a estudos anteriores. Estudos futuros devem investigar anormalidades genéticas nas sequencias codificadoras de p14 e incluir todos os tipos de tumor epitelial ovariano.

**Palavras-chave:** ovário; tumor epitelial ovariano; câncer de ovário; p14; ARF; p16; p53; imuno-histoquímica

## ABSTRACT

**Background:** Abnormalities in tumor suppressors p14, p16 and p53 are reported in several human cancers. In ovarian carcinogenesis, p16 and p53 have been extensively studied, but p14 was only analyzed in carcinomas. **Aim:** This study seeks to determine p14, p16 and p53 immunohistochemical expression in benign, borderline and malignant ovarian epithelial tumors and correlate them with survival and clinical variables. **Methods:** Cross-sectional study utilizing immunohistochemical staining of p14, p16 and p53 in paraffin-embedded tissue samples from ovarian epithelial tumors obtained from Hospital de Clinicas de Porto Alegre. **Results:** p14 was positive in 93% of benign, 94% of borderline and 60% of malignant tumors. Loss of expression was statistically associated with carcinomas. p16 was positive in 94.6% of carcinomas, 75% of borderline and 45.7% of benign tumors. p53 was positive in 29.7%, 16.7% and 2.9% of malignant, borderline and benign tumors, respectively. Carcinoma subtypes showed no difference in expression. **Conclusions:** To our knowledge, this is the first description of p14 expression in benign and borderline tumors. It remains stable in benign and borderline tumors, while carcinomas show a significant absence of staining. This may indicate p14 abnormalities occur later in carcinogenesis. p16 and p53 expression rates show similar results to previous reports. Future studies should investigate genetic abnormalities in p14 coding sequences and include all types of ovarian epithelial tumors.

**Keywords:** ovary; ovarian epithelial tumor; ovarian cancer; p14; ARF; p16, p53; immunohistochemistry

## **INTRODUÇÃO**

O câncer de ovário é uma doença com incidência relativamente baixa, mas alta taxa de mortalidade (1–3). Pode ser de linhagem epitelial, germinativa ou estromal. Neoplasias malignas epiteliais correspondem a 90% de todos os casos (4). Devido à baixa incidência dos outros tipos, o presente estudo e revisão da literatura serão apenas sobre os tumores epiteliais. A maioria dos tumores são benignos (5). Os carcinomas geralmente são de alto grau histológico e diagnosticados em estágios avançados, levando a alta mortalidade e baixa sobrevida livre de doença (6,7). Apesar de estudos de base populacional mostrarem diminuição da incidência nas últimas décadas, programas de rastreio se mostraram inefetivos e a evolução dos métodos terapêuticos não conseguiu produzir redução da mortalidade (4,8,9). Alterações nas proteínas reguladoras do ciclo celular são encontradas em tumores epiteliais ovarianos, mostrando diferença entre benignos, borderline e malignos (10). Essas anormalidades, combinadas com outros achados clínicos e histológicos, levaram a novas hipóteses sobre a carcinogênese ovariana (11,12). Devido à incerteza sobre sua origem, formas de prevenção e rastreio e ausência de melhora na resposta às opções de tratamento atuais, faz-se necessário continuado estudo sobre suas características clínicas, histopatológicas e moleculares.



## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **1. Estratégias para localizar e selecionar as informações**

Foram realizadas buscas de artigos científicos no PUBMED utilizando as combinações de palavras-chave apresentadas na figura 1, na próxima página.

Os seguintes livros foram utilizados: WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs (Kurman, R; 2014), Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract (Kurman, R; 2011), Rotinas em Ginecologia (Freitas, F; 2011), Lewin's Genes XI (Krebs, JE; 2014), The Cell: A Molecular Approach (Cooper, GM; 2013), Molecular Biology of The Cell (Alberts, E; 2007), Human Molecular Genetics (Strachan, T; 2011).

Foram utilizados dados dos websites das seguintes instituições: Instituto Nacional de Câncer, International Agency for Research on Cancer, American Cancer Society e Association of the Nordic Cancer Registries.

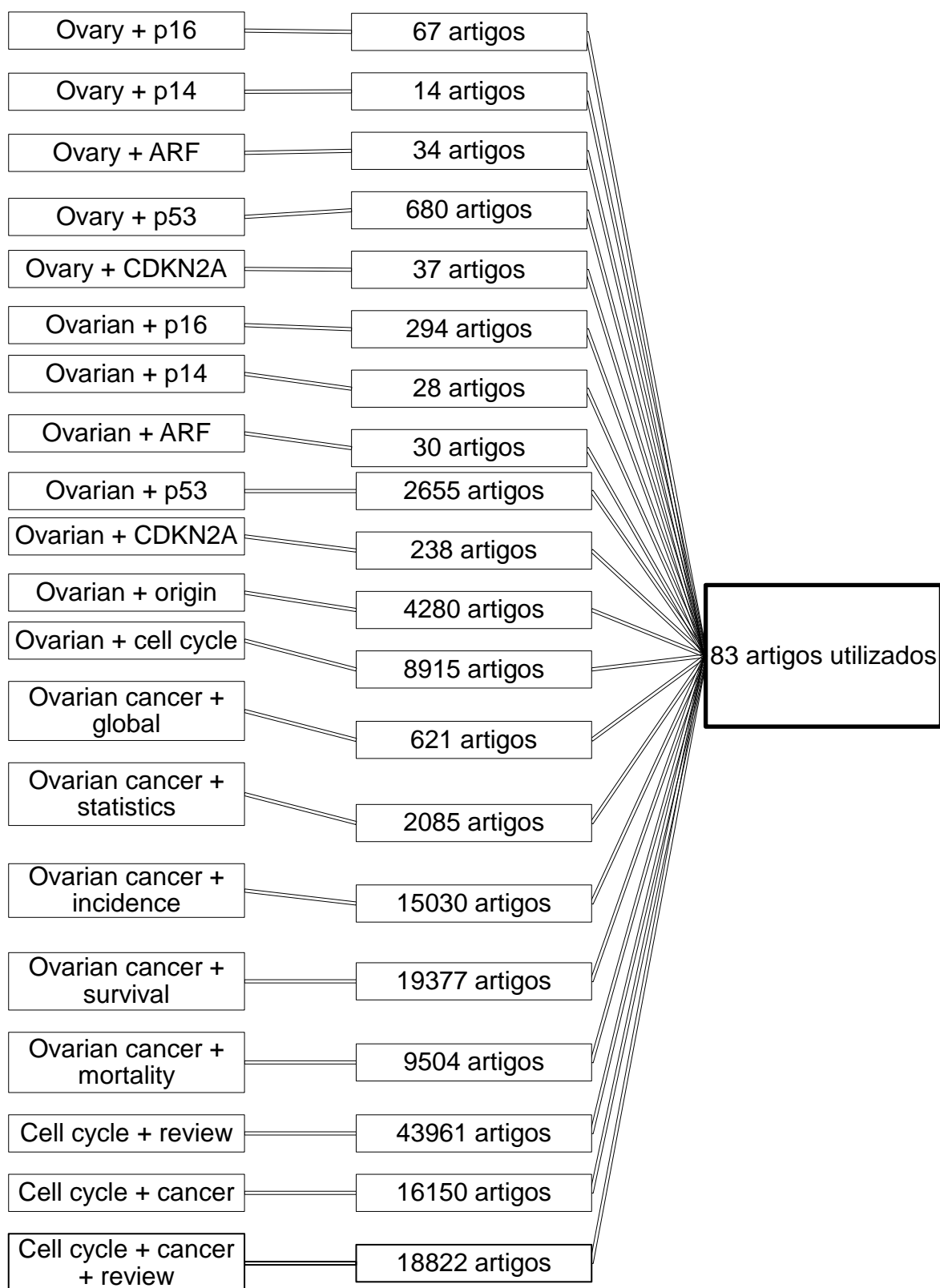


Figura 1 - Estratégia de busca de artigos científicos utilizando o PUBMED.

## 2. Marco conceitual

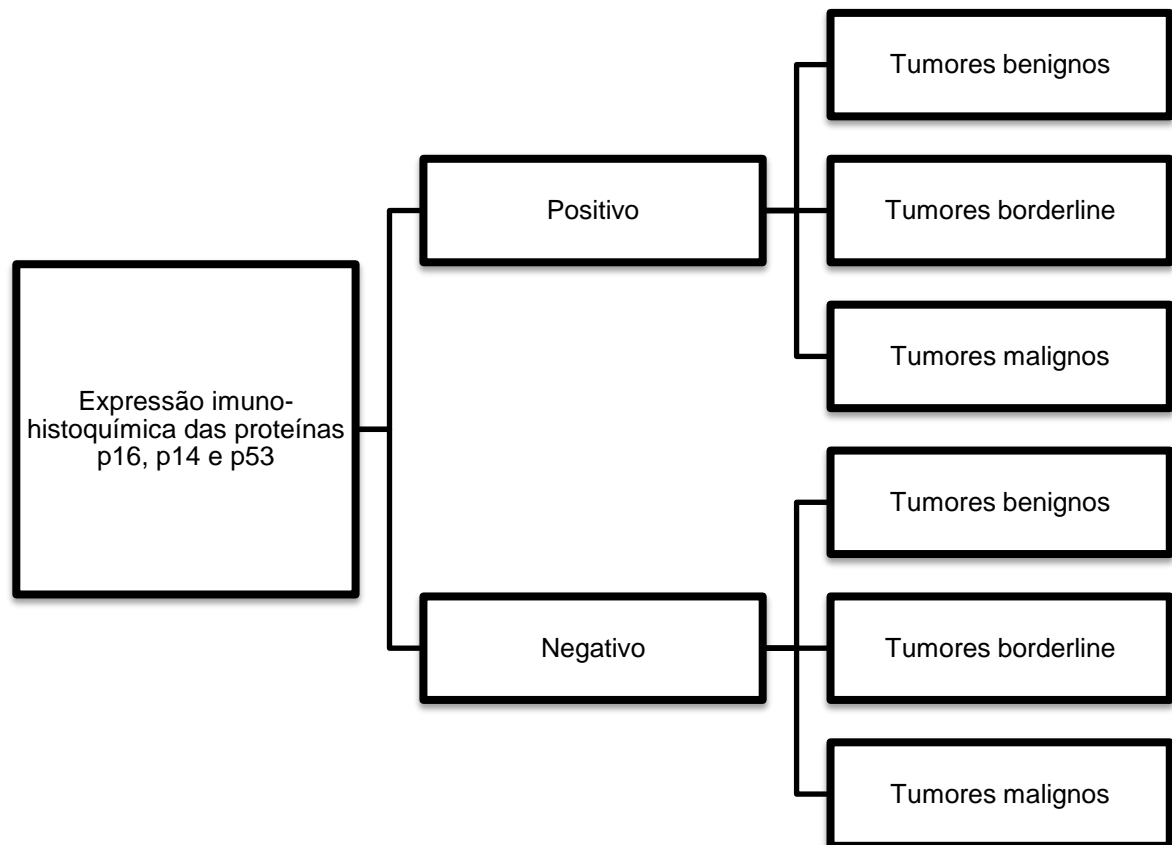


Figura 2 - Marco conceitual da dissertação.

O marco conceitual da dissertação é baseado na expressão imunohistoquímica das proteínas p16, p14 e p53. De acordo com nossas hipóteses, a positividade ou negatividade desses marcadores mostra diferenças entre tumores ovarianos benignos, borderline e malignos.

### **3. Epidemiologia**

Anualmente são diagnosticados 238.719 casos de câncer de ovário em todo o mundo e 151.917 mulheres morrem em decorrência da doença (1). No Brasil, ocupa o 4ª lugar em incidência entre as neoplasias ginecológicas, superada por mama, colo uterino e corpo uterino. O Distrito Federal apresenta a maior taxa (8,81 casos a cada 100 mil mulheres), seguido pelo Rio Grande do Sul (7,96). Porto Alegre exibe taxa ainda mais elevada (13,28) (2). No Brasil, no período 2004-2013, mostrou a quinta maior taxa de mortalidade por câncer em mulheres e a terceira entre as neoplasias ginecológicas, precedida por mama e colo uterino (3). As neoplasias malignas ovarianas primárias são divididas em três linhagens: epiteliais, germinativas e estromais. As neoplasias epiteliais malignas são chamadas de carcinomas e estes perfazem a grande maioria dos casos (90%), seguidos por neoplasias estromais (3-6%) e germinativas (0,5 a 5%) (4). No entanto, considerando todas as neoplasias epiteliais, cerca de 26% são malignas (carcinomas), 71% são benignas (adenomas) e 4% são consideradas borderline (tumor proliferativo atípico) (5).

### **4. Fatores de risco**

Os fatores de risco mais bem estabelecidos para o carcinoma ovariano são idade e genética, geralmente sendo diagnosticado na peri ou pós-menopausa, sendo 60 anos a idade média em que ocorrem. Em mulheres com mais de 65 anos, além da incidência aumentada, também é relatado aumento da mortalidade em relação a pacientes mais jovens (4). A história familiar tem grande impacto na incidência. Enquanto o risco de desenvolvimento na população feminina geral é de menos de 2%, este aumenta para 4-5% entre mulheres com uma familiar afetada, 7% naquelas com duas familiares afetadas e 30% em portadoras de mutação de BRCA1 ou BRCA2 (13). Pacientes com história prévia de carcinomas mamários ou com história familiar dessa doença também exibem aumento de risco de 20 a 25% (14,15). Encontram-se maiores taxas em caucasianas e em países onde essa população predomina (15). A incidência também é maior em pacientes de ascendência judaica Ashkenazi. Essa população exibe frequência de mutação de BRCA em 1 a cada 50 indivíduos (contrastando com a frequência da população geral, que varia entre 1 a 300 a 1 a 800 indivíduos). Quando diagnosticadas com carcinoma ovariano, exibem taxa de 40% de mutação, enquanto na população geral essa taxa é de 10%. Outras síndromes familiares também possuem risco elevado. Portadoras da síndrome de Lynch tem 10% de risco de

desenvolver a doença. Também é observado aumento da incidência na síndrome de Cowden, Peutz-Jeghers e polipose associada ao MUTYH (6,14,16,17).

Outros fatores de risco relatados incluem obesidade, exposição a hormônios, endometriose e doença inflamatória pélvica. O uso de talcos na região genital e hábitos alimentares foram associados a aumento de risco por alguns autores, mas os achados são controversos (14,16,18). Os fatores de proteção atualmente conhecidos são uso de anticoncepcional oral, gravidez, amamentação e ligadura tubária (19). Usuárias de anticoncepção oral por qualquer período exibem redução de risco de 25% em comparação àquelas que nunca utilizaram. Além disso, o efeito protetor aumenta com o tempo de uso. A paridade também exibe efeito cumulativo, com risco relativo de 0,81 a cada filho (15,17).

## **5. Prevenção**

Considerados os fatores de risco e proteção, a prevenção do câncer de ovário pode ser feita pelo uso de anticoncepcionais orais e com a remoção dos ovários e/ou tubas uterinas. Devido ao baixo risco de desenvolvimento na população geral, não está indicada salpingooforectomia bilateral em mulheres pré-menopáusicas. Entretanto, com base na teoria da origem tubária dos carcinomas ovarianos, pode ser oportuna a realização de salpingectomia bilateral concomitante a histerectomia por condições benignas. Em 2012, essa estratégia foi recomendada pelo Gynecological Oncology Group of Canada. Em um estudo de caso-controle baseado em registros populacionais dinamarqueses, a salpingectomia bilateral reduziu o risco de carcinomas em 42% na população geral. Numa coorte sueca, a salpingectomia bilateral foi associada com uma redução de risco de 65%, enquanto a salpingooforectomia bilateral mostrou redução de risco de 94% (12,19,20).

Em portadoras de síndromes com risco elevado, deve ser oferecida a realização de salpingooforectomia bilateral redutora de risco a partir dos 35 anos, apesar de não existirem estudos sobre sua efetividade. O tema ainda é controverso e, em 2008, o American Congress of Obstetricians and Gynecologists contraindicou o procedimento em mulheres abaixo de 45 anos, devido aos efeitos colaterais, como a osteoporose e doenças cardiovasculares (14,15,20,21).

## **6. Rastreio**

Atualmente, não há programa de rastreio universalmente aceito e recomendado por nenhuma organização nacional. A maioria das tentativas anteriores utilizaram dosagem sérica de CA-125 e/ou ecografia transvaginal. Entretanto, a aplicação desses métodos não mostrou efeito na mortalidade e gerou um número elevado de falsos positivos e procedimentos invasivos desnecessários. Outros testes também foram utilizados, incluindo o exame de sangue OvaSure™, que mensurava seis biomarcadores. Contudo, foi retirado do mercado devido à falta de validação externa. O exame OvaCheck™ utilizava proteômica, mas também não foi validado. A Society of Gynecological Oncologists afirma que ambos os testes precisam ser mais bem estudados antes de serem oferecidos ao público (7,14,22,23). O rastreio de mutações de BRCA1 e BRCA2 na população em geral teria possível efeito preventivo, contudo, os custos associados à testagem e aconselhamento genéticos ainda são proibitivos (20). Vários autores indicam rastreio em pacientes com história familiar de câncer de mama e/ou ovário, consideradas de alto risco, apesar de existirem variações nessa definição (6,14,17). Freitas *et al.* (21) indica, a partir dos 35 anos, realização anual ou semestral de ecografia transvaginal e dosagem sérica de CA-125 para as pacientes desse grupo.

## **7. Diagnóstico**

O diagnóstico geralmente é feito após a apresentação de sintomas, o que é problemático, visto que frequentemente são inespecíficos e se sobrepõem com outras condições mais comuns. De acordo com a metanálise de Ebell *et al.* (7), os sintomas mais úteis para o diagnóstico são massa, distensão ou aumento da circunferência abdominal, dor ou inchaço abdominal/pélvico, perda de apetite e história familiar de câncer ovariano. Entretanto, a ausência desses sintomas não exclui a presença da doença.

A ecografia transvaginal é o exame não-invasivo mais utilizado durante a investigação dos sintomas. Os achados sugestivos de malignidade são: lesões com superfície irregular, projeções papilares, septações, componente sólido, paredes espessas e fluxo sanguíneo no interior da lesão. Lesões císticas simples ou com septos finos raramente são associadas com neoplasias malignas. Na presença de exame ultrassonográfico sugestivo de malignidade, é realizada a dosagem sérica do CA-125. Ele é o principal marcador sérico de tumores epiteliais ovarianos, sendo

detectado em 80% dos carcinomas não-mucinosos e estando também presente em outros tecidos derivados do epitélio celômico, como tubas uterinas, endométrio, endocérvice e mesotélio da pleura, peritônio e pericárdio. Em mulheres pós-menopáusicas, é considerado indicativo de carcinoma ovariano quando for maior que 35 U/mL. Em pré-menopáusicas, existem muitos falso-positivos causados por condições benignas como endometriose, adenomiose, miomatose uterina e doença inflamatória pélvica. Nessas pacientes, apenas valores maiores que 200 U/mL são valorizados na investigação de malignidade ovariana (21).

O diagnóstico e estadiamento definitivos são realizados com laparotomia exploradora e exame anatomopatológico do tumor (21). A tabela abaixo mostra o estadiamento dos tumores malignos ovarianos, de acordo com a 7ª edição da classificação de tumores malignos da União Internacional para Controle do Câncer (UICC):

Tabela 1 - Classificação TNM e FIGO dos tumores ovarianos. Fonte: Kurman, R.,;2014 (24)

TNM	Ovário	FIGO
TX	Tumor primário não-avaliável	
T0	Sem evidência de tumor primário	
T1	Limitado aos ovários	I
T1a	Um ovário, cápsula intacta	IA
T1b	Ambos os ovários, cápsulas intactas	IB
T1c	Derramamento cirúrgico, cápsula rompida, tumor na superfície, células malignas em ascite ou lavados peritoneais	IC
T1c1	Derramamento cirúrgico do conteúdo	IC1
T1c2	Cápsula rompida antes da cirurgia ou tumor na superfície	IC2

T1c3	Células malignas em ascite ou lavados peritoneais	IC3
T2	Extensão pélvica	II

Tabela 1 - Classificação TNM e FIGO dos tumores ovariano (continuação). Fonte: Kurman, R; 2014 (24)

TNM	Ovário	FIGO
T2a	Útero, trompa (s)	IIA
T2b	Outros tecidos pélvicos	IIB
T3 e/ou N1	Metástase em linfonodo retroperitoneal e/ou metástase extra-pélvica comprovadas citologicamente ou histologicamente	III
N1	Metástase somente em linfonodo retroperitoneal	IIIA1
N1a	Metástase em linfonodo retroperitoneal $\leq$ 10 mm	IIIA1i
N1b	Metástase em linfonodo retroperitoneal $>$ 10 mm	IIIA1ii
T3a	Metástase peritoneal extra-pélvica microscópica	IIIA
T3b	Metástase peritoneal extra-pélvica macroscópica $\leq$ 2 cm	IIB
T3c	Metástase peritoneal extra-pélvica macroscópica $>$ 2 cm	IIIC
M1	Metástase a distância (exclui metástase peritoneal)	IV
M1a	Derrame pleural com citologia positiva	IVA
M1b	Metástase parenquimatosa e metástase em órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodos inguinais e fora da cavidade abdominal)	IVB

Somente 25% das pacientes são diagnosticadas nos estágios I ou II, 58% no estágio III e 17% no estágio IV, levando a uma baixa sobrevida livre de doença e alta taxa de mortalidade (6,7). O estágio é um dos grandes determinantes do prognóstico.



Pacientes diagnosticadas no estágio I tem taxa de recorrência de menos de 10%, enquanto aquelas no estágio IV exibem recorrência de 90% (6). A tabela a seguir mostra as taxas de sobrevida relativa em 5 anos, registradas pelo National Institute of Cancer:

Tabela 2 - Taxa de sobrevida relativa em 5 anos dos carcinomas ovarianos. Fonte: American Cancer Society; 2016 (25)

Estágio	Taxa de sobrevida relativa em 5 anos
I	90%
IA	94%
IB	92%
IC	85%
II	70%
IIA	78%
IIB	73%
III	39%
IIIA	59%
IIIB	52%
IIIC	39%
IV	17%

Sopik *et al.* (8,15), utilizando registros populacionais norte-americanos, observou um declínio nas taxas de incidência e mortalidade entre 1975 e 2001, estando relacionado à introdução e popularização do uso de anticoncepcionais orais.

A diminuição na mortalidade foi associada à diminuição da incidência, mas não foi encontrada relação com rastreamento mais eficiente ou diagnósticos mais precoces. O avanço nas opções terapêuticas não mostrou efeito na taxa de mortalidade, mas aumentou a sobrevida livre de doença. Resultados similares foram encontrados em estudos de base populacional na França e nos países nórdicos (4,9)

## **8. Tratamento**

O principal determinante do tratamento é o estágio no momento do diagnóstico, determinado pelo estadiamento cirúrgico, baseado nos achados da laparotomia, resultados histopatológicos e citopatológicos coletados. A cirurgia é a base do tratamento e seu objetivo principal é a citorredução: reduzir o volume tumoral até não existir mais doença visível. Caso isso não seja possível, o objetivo é a citorredução ótima, definida como nódulos residuais que variam entre 0,5 cm e 3,0 cm, de acordo com a fonte (13).

O protocolo cirúrgico básico envolve: incisão longitudinal mediana; aspiração do líquido peritoneal para exame citopatológico; avaliação das cúpulas diafragmáticas e biópsia de áreas suspeitas; retirada do tumor para exame transoperatório de congelação; avaliação de toda a superfície peritoneal. órgãos abdominais e pélvicos, com biópsia de áreas suspeitas; histerectomia total extrafascial com salpingooforectomia bilateral; retirada de toda a massa tumoral, evitando deixar doença residual com diâmetro maior que 1 cm; linfadenectomia para-aórtica e pélvica bilateral; omentectomia infracólica; descrição minuciosa dos achados cirúrgicos (21).

Deve-se, também, fazer abordagens terapêuticas distintas conforme o estágio em que se encontra a paciente:

Estágio I:

IA e IB com histologia tumoral G1 ou G2: cirurgia primária com estadiamento

IC, IA e IB com histologia tumoral G3 ou de células claras: cirurgia primária com estadiamento e quimioterapia sistêmica adjuvante

Estágio II: cirurgia primária com estadiamento e citorredução e quimioterapia sistêmica adjuvante

Estágio III: cirurgia primária com estadiamento e citorredução e quimioterapia sistêmica adjuvante

Estágio IV: cirurgia primária com estadiamento e citorredução e quimioterapia sistêmica adjuvante ou tratamento quimioterápico exclusivo

A realização de cirurgias conservadoras pode ser considerada em casos de pacientes com desejo de gestar ou em tumores borderline.

Como em quase todas as neoplasias malignas, há recomendação de seguimento para avaliação precoce de possíveis recidivas. No caso das neoplasias epiteliais ovarianas, o protocolo pós-cirúrgico prevê exame físico trimestral durante o primeiro ano, quadrimestral no segundo e semestral do terceiro ao quinto anos; dosagem de CA-125 trimestral durante o primeiro ano, semestral no segundo e anualmente do terceiro ao quinto anos; exames complementares (anuais): raio-X de tórax, ecografia abdominal total ou tomografia computadorizada, provas de função hepática, exame citológico vaginal e colposcopia (21).

## **9. Tumores epiteliais ovarianos**

A Organização Mundial da Saúde (OMS), conforme já foi dito, classifica as neoplasias ovarianas primárias de acordo com seu tecido de origem: epiteliais, germinativas, do estroma e miscelâneas. Os tumores epiteliais são os mais comuns, correspondendo a 90% de todos os casos. São classificados de acordo com seu epitélio de revestimento em serosos, mucinosos, endometrioides, de células claras, de Brenner, seromucinosos e carcinomas indiferenciados. Segundo sua arquitetura e atipias citológicas, são divididos em adenomas, tumores borderline e carcinomas. A classificação a seguir é a adotada pela OMS na última edição de sua classificação de tumores do trato reprodutor feminino (24):

### **9.1. Tumores serosos**

Neoplasias epiteliais contendo células epiteliais semelhantes ao epitélio da tuba uterina (epitélio seroso).

#### **9.1.1. Tumores serosos benignos**

São os tumores epiteliais mais comuns e perfazem dois terços de todos os tumores serosos. Ocorrem em todas as faixas etárias, mais comumente em pacientes

entre 40-60 anos, geralmente assintomáticas. O sintoma mais comum é a dor pélvica crônica, relacionada a grandes volumes tumorais, podendo também causar torção ovariana. São bilaterais em 12-23% dos casos. Possuem tamanho médio de 5-8 cm. Cistoadenomas são císticos, com superfície interna lisa, preenchidos por fluido claro e aquoso. Cistoadenofibromas exibem pequenas projeções fibrosas no interior do cisto. Adenofibromas são sólidos com pequenos espaços glandulares. Papilomas superficiais são exofíticos, localizados na superfície externa do ovário. No exame microscópico, são revestidos por epitélio seroso sem atipias nucleares ou proliferação. Área de proliferação epitelial compondo até 10% do volume tumoral é chamada de

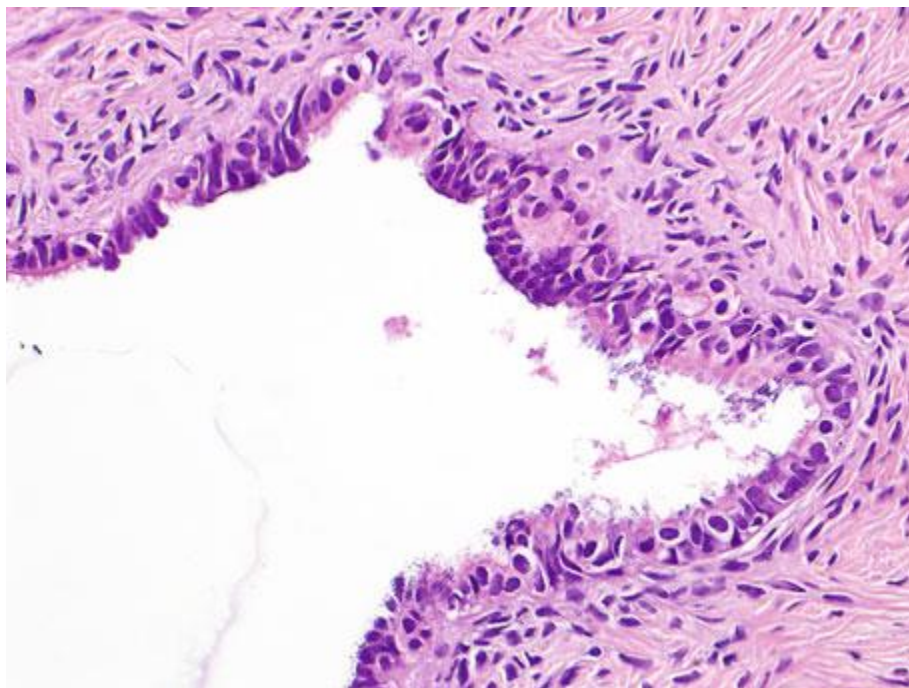


Figura 3 - Cistoadenoma seroso. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

proliferação focal. Todos os subtipos demonstram comportamento benigno, ocorrendo raras recorrências em caso de ressecção incompleta (5,24).

### **9.1.2. Tumores serosos borderline/tumores serosos proliferativos atípicos**

São o tipo de tumores borderline mais comum. A idade média do diagnóstico é de 42 anos. Os fatores de risco são os mesmos do carcinoma, mas sua incidência é consideravelmente menor do que a incidência dos carcinomas serosos de alto grau (CSAG), além de ocorrerem em uma faixa etária mais jovem. A grande maioria dos

casos se apresenta como massas confinadas ao ovário. Os sintomas geralmente são semelhantes aos benignos, mas exames de imagem mostram maior complexidade lesional. Normalmente são císticos e maiores que 5 cm de diâmetro, sendo bilaterais em dois terços das pacientes. Contém projeções e vegetações friáveis no interior dos cistos, que também podem estar presentes na superfície externa.

Exibem mais proliferação epitelial e atipia que tumores benignos, mas menos que carcinomas serosos de baixo grau. Sua principal característica é a proliferação, formando um padrão hierárquico de ramificação de papilas irregulares: grandes papilas se ramificam em pequenas papilas, que por sua vez formam pequenos tufo de células epiteliais destacadas. Citologicamente, exibem cílios e atipia nuclear leve. A presença de agrupamentos de células eosinofílicas isoladas no estroma, medindo menos de 5 mm de diâmetro, é chamada de microinvasão. Também pode ser encontrado carcinoma microinvasor, definido como ninhos sólidos ou cribriformes no estroma, de histologia carcinomatosa, medindo até 5 mm de diâmetro

Tumores borderline podem exibir implantes nas cavidades pélvica e abdominal, classificados como implantes invasivos ou não invasivos. Implantes invasivos formam pequenos grupamentos sólidos circundados por espaços vazios, com padrão de crescimento papilar ou cribriforme, semelhantes ao carcinoma seroso de baixo grau (CSBG). Normalmente mostram invasão do tecido subjacente, mas lesões confinadas à superfície com características histológicas típicas também são incluídas nesse grupo. Implantes invasivos se comportam como carcinomas serosos de baixo grau. Implantes não-invasivos são compostos por papilas ramificadas hierarquicamente ou grupamentos de células com atipia nuclear leve a moderada. Podem estar restritas à superfície do tecido ou no estroma. Em linfonodos, podem ser encontrados implantes, endossalpingiose (glândulas benignas de epitélio seroso) e grupamentos de células isoladas. Ocasionalmente, associada a tumor borderline, é encontrada metástase linfonodal com característica de carcinoma seroso de baixo grau, devendo ser classificada como tal.

A sobrevida é dependente do estágio do diagnóstico inicial. A maioria dos casos tem comportamento benigno, mas uma minoria exibe curso indolente de até 20 anos. Implantes invasivos estão presentes em 8% das pacientes e são o preditor prognóstico mais importante. O envolvimento linfonodal somente é importante no caso

de metástase de CSBG. Pacientes com doença confinada ao ovário tem sobrevida em 10 anos de 96-100%, enquanto naquelas com implantes invasivos é de 66%. Podem recorrer como tumores borderline ou carcinomas serosos de baixo grau. A progressão para CSBG ocorre em 5% dos casos, sendo a principal causa de mortalidade. Também se considera que praticamente todos os casos fatais, além da progressão para CSBG, sejam decorrentes de estadiamento ou amostragem histológica insuficientes. A presença de microinvasão, carcinoma microinvasor, implantes não invasivos, endossalpingiose e grupamentos de células isoladas em linfonodos não afetam a sobrevida (5,24).

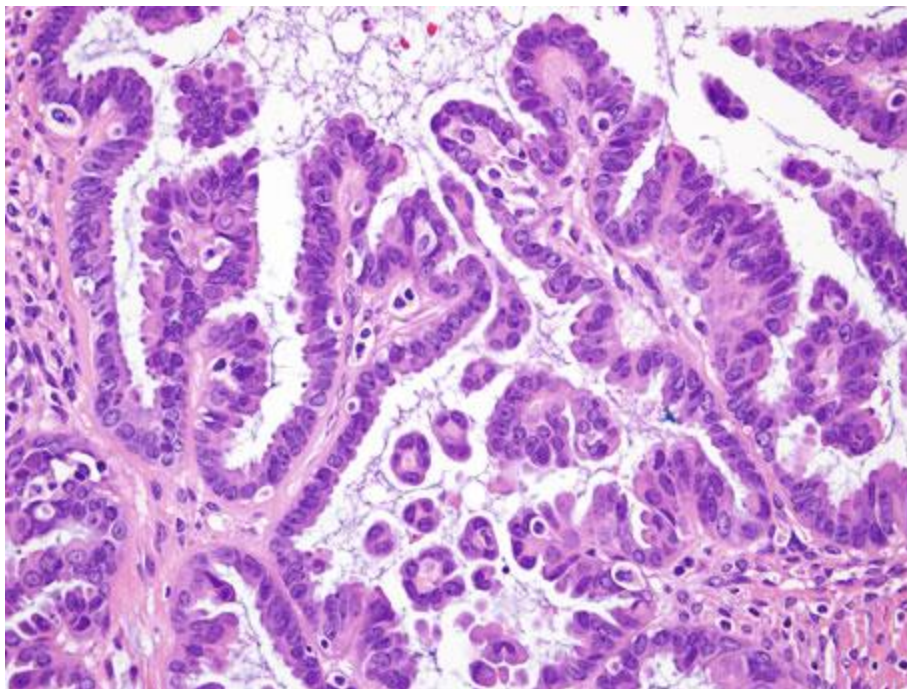


Figura 4 - Tumor seroso borderline. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

### **9.1.3. Tumores serosos borderline – variante micropapilar/carcinomas serosos de baixo grau não invasivos**

Um tumor não invasivo cuja peculiaridade é a arquitetura ramificada não hierárquica (micropapilas emanando diretamente de grandes papilas) complexa, de padrão micropapilar e/ou cribriforme. Suas características clínicas e macroscópicas são semelhantes aos tumores borderline. As micropapilas são finas, com eixo conjuntivo escasso ou ausente, exibindo altura cinco vezes maior que sua largura. Emanam diretamente de papilas grandes e fibróticas. Ao contrário dos tumores serosos borderline convencionais, que tem células colunares ciliadas, esses tumores

mostram células cuboidais ou poligonais sem cílios, citoplasma escasso e núcleos com atipia moderada e nucléolos proeminentes. Padrões cribriformes são observados e podem predominar.

Enquanto tumores borderline convencionais apresentam-se em estágios avançados em 13% dos casos, essa variante exibe taxa de 27%. Implantes invasivos são encontrados em 50% dos casos. As taxas de sobrevida e recorrência observadas são semelhantes às do carcinoma seroso de baixo grau, levando à especulação que uma maior amostragem histológica revelaria áreas invasoras. Estudos de expressão gênica mostram mais similaridades com carcinomas serosos de baixo grau do que com tumores borderline, sugerindo que essa lesão seja um passo intermediário na progressão borderline - carcinoma invasor (5,24).

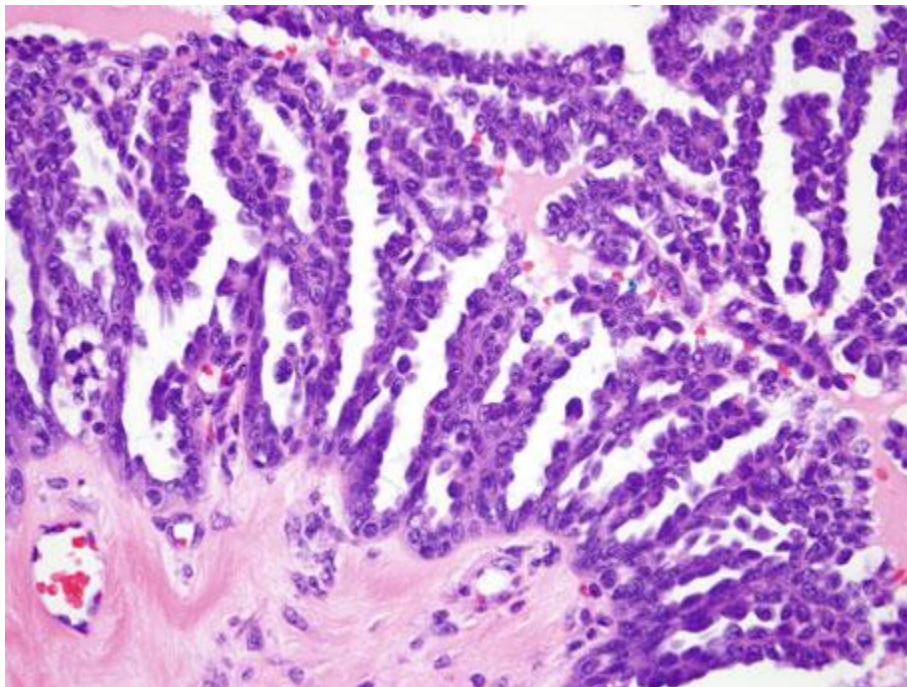


Figura 5 - Tumor seroso borderline, variante micropapilar.  
Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

#### **9.1.4. Carcinomas serosos de baixo grau**

São relativamente raros, perfazendo apenas 6% dos carcinomas serosos. Formam massas ovarianas, que podem ser achados incidentais ou se tornarem sintomáticas. A idade média de diagnóstico é de 45 anos, normalmente diagnosticados em pacientes 10-20 anos mais jovens do que aquelas com carcinoma seroso de alto grau. A maioria se apresenta em estágios avançados (94%), mas o

volume da doença geralmente é menor do que no CSAG. Exames de imagem mostram lesões císticas com septos espessos e/ou componentes nodulares com vascularização aumentada. 80% a 90% são bilaterais, com tamanho médio de 11 cm. São císticos com projeções papilares (intracísticas ou na superfície). Também são comumente encontradas áreas de calcificação.

O critério histológico básico observado é a invasão do estroma ovariano pela neoplasia, exibindo diversos padrões arquiteturais, incluindo células isoladas, ninhos irregulares, micropapilas ou macropapilas. Esses padrões coexistem e se mesclam em muitos casos. Citologicamente, são compostos por células pequenas e uniformes, com atipia nuclear leve a moderada, nucléolo proeminente e pouco pleomorfismo. Tem baixo índice mitótico (menos que 12 mitoses por 10 campos de grande aumento) e ausência de necrose. Psamomas são frequentes. Alguns autores descrevem a variante psamocarcinoma, quando os psamomas ocupam mais de 75% das papilas. Entretanto, não é um diagnóstico relatado na classificação da OMS.

Possuem crescimento indolente e resistência à quimioterapia e, quando recorrem, geralmente mantêm suas características de baixo grau. São raros os relatos de progressão para carcinoma de alto grau. Quando restritos ao ovário, tem ótimo prognóstico. Em estágios avançados a sobrevida em 5 anos e 10 anos é, respectivamente, 85% e 50%. Doença residual pós-cirúrgica maior que 2 cm é preditor de mau prognóstico (5,24).

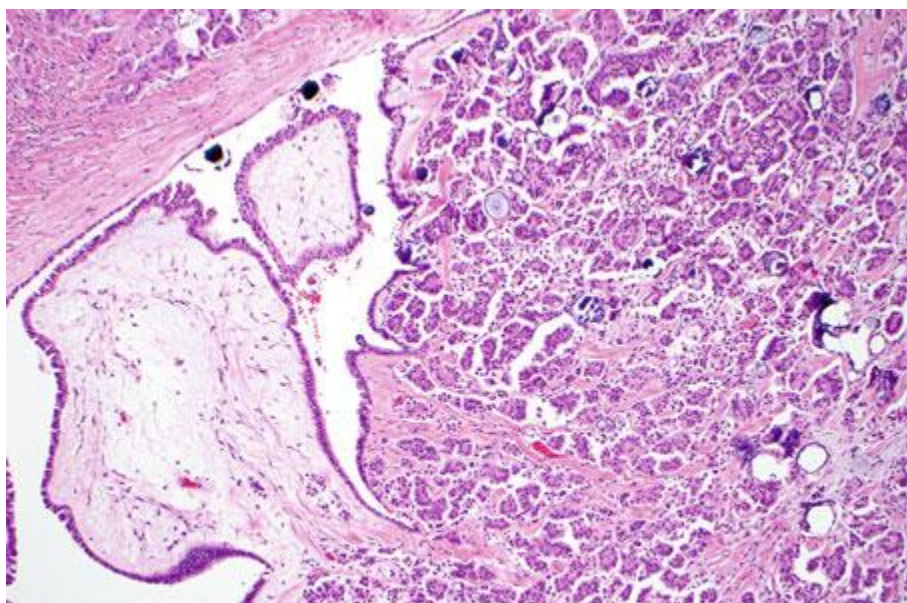


Figura 6 - Carcinoma seroso de baixo grau. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)



### **9.1.5. Carcinomas serosos de alto grau**

O tipo mais comum de câncer ovariano e correspondendo a 50-60% dos carcinomas. A idade média de diagnóstico varia entre 57 e 63 anos. Os sintomas mais comuns são dor e distensão abdominal. Outros incluem anorexia, sintomas gastrointestinais e urinários. Devido à falta de especificidade sintomática, o diagnóstico é frequentemente postergado. Exames de imagem mostram massas volumosas, complexas e hipervascularizadas, além de ascite e nódulos peritoneais. O CA-125 geralmente é elevado, na faixa de 500-1000 U/ml. Dois terços dos casos são bilaterais. Geralmente são volumosos, mas em 30% dos tumores os ovários tem aspecto normal ou apresentam pequenos nódulos superficiais. São multiloculados, revestidos por vegetações friáveis, com áreas sólidas necróticas e hemorrágicas. Ocasionalmente são totalmente sólidos.

Formam massas celulares sólidas com espaços fendiformes. Também são vistas áreas papilares, glandulares e cribriformes, além de extensa necrose. Citologicamente, exibem núcleos grandes, hipercromáticos e pleomórficos, incluindo formas bizarras e multinucleadas. Os nucléolos são proeminentes, grosseiros e eosinofílicos. Tumores com grau nuclear intermediário, correspondente ao grau G2 da antiga graduação de carcinomas ovarianos, devem ser considerados de alto grau. O índice mitótico é elevado (mais de 12 mitoses por campo de grande aumento), com mitoses atípicas. Raros tumores são intracísticos, sem invasão aparente. Podem exibir arquitetura semelhante a tumores borderline, mas a presença de atipia citológica de alto grau automaticamente os classifica como carcinoma de alto grau. Uma variante do CSAG é o carcinoma de células transicionais, classificado como tumor urotelial até a penúltima classificação da OMS. Entretanto, estudos imuno-histoquímicos comprovaram sua origem serosa.

O principal fator prognóstico é o estágio inicial. Quando os tumores se tornam sintomáticos, já se encontram em estágios avançados em 75-80% das pacientes, com taxa de cura menor que 25%. Nesses casos, o volume de tumor residual pós-citorredução é o principal determinante do prognóstico, sendo significativamente melhor quando a doença é totalmente ressecada. Ainda não está claro se essa

associação é devida a uma ressectabilidade decorrente de uma neoplasia mais favorável ou se um maior esforço na realização da citorredução leva a melhores desfechos (5,24)

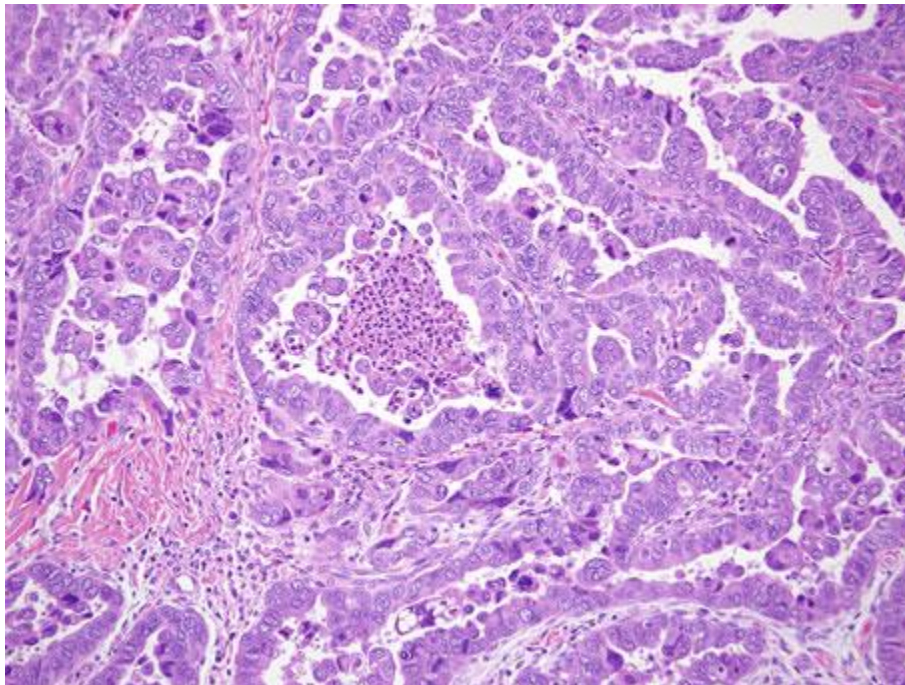


Figura 7 - Carcinoma seroso de alto grau. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

## **9.2. Tumores mucinosos**

Neoplasias epiteliais contendo células epiteliais mucinosas de tipo gastrointestinal. O epitélio pode ser gástrico foveolar (20%) ou intestinal (80%).

### **9.2.1. Tumores mucinosos benignos**

Os cistoadenomas perfazem cerca de 13% de todos os tumores epiteliais ovarianos benignos e 80% de todos os tumores mucinosos ovarianos primários, enquanto adenofibromas são incomuns. A idade média de diagnóstico é 50 anos, mas são encontrados numa ampla faixa etária. Os sintomas mais comuns são dor ou massa abdominal/pélvica. São unilaterais em 95% dos casos. Cistoadenomas tem tamanho médio de 10 cm, são císticos, uniloculados ou multiloculados, preenchidos por material gelatinoso espesso, com revestimentos interno e externo lisos. Adenofibromas são sólidos e pequenos, com pequenos espaços glandulares.

Cistoadenomas são revestidos por epitélio mucinoso simples, não-estratificado. 10% dos casos estão associados com tumores de Brenner ou cistos dermóides. Adenofibromas possuem o mesmo revestimento epitelial mas possuem um estroma fibromatoso denso e proeminente. Citologicamente, não exibem atipias nucleares ou proliferação epitelial. Assim como os tumores seroso benignos, podem conter proliferação focal. Seu comportamento é benigno. Recorrências são raras e associadas com ressecção incompleta (5,24)

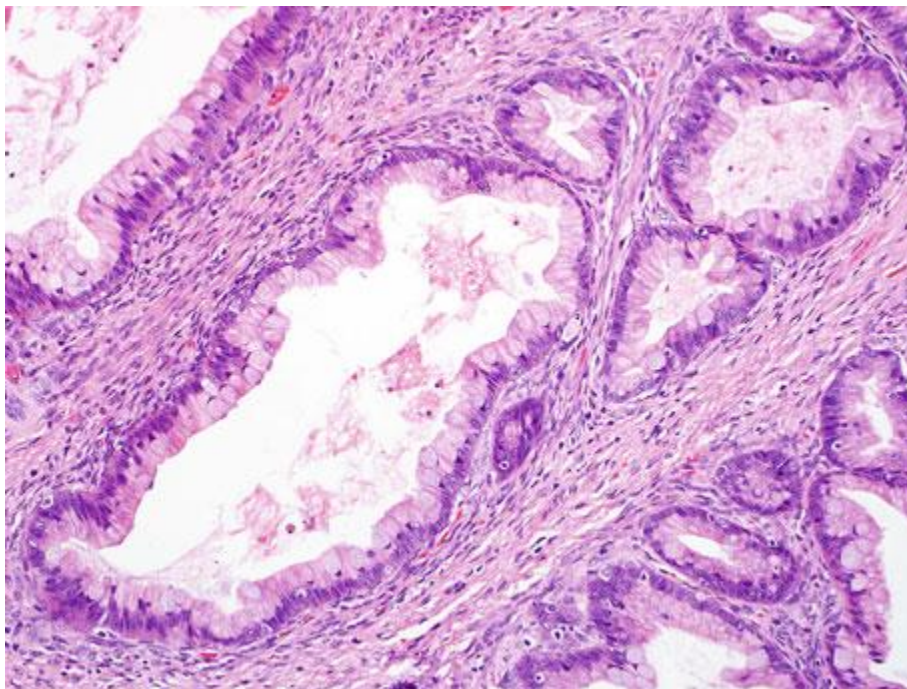


Figura 8 - Cistoadenoma mucinoso. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

### **9.2.2. Tumores mucinosos borderline/tumores mucinosos proliferativos atípicos**

Compõem 30-50% dos tumores borderline, atrás dos serosos. A idade média de diagnóstico é 40-49 anos, sendo relatados em pacientes entre 13-88 anos. O sintoma mais comum é massa abdominal unilateral. A bilateralidade é rara e deve levantar a suspeita de carcinoma metastático. Não produzem implantes peritoneais, portanto são sempre estágio I. Seu tamanho médio é de 21,5 cm. São císticos, uni ou multiloculados, com material gelatinoso espesso. Os revestimentos interno e externo geralmente são lisos, mas podem ser encontradas áreas de crescimento sólido intracísticas. As áreas sólidas podem conter focos de carcinoma, devendo ser as mais amostradas no exame anatomopatológico.

São revestidos por epitélio de tipo gastrointestinal mostrando proliferação maior que os tumores benignos, formando tufos e papilas vilosas ou filiformes. Citologicamente, tem atipia nuclear leve a moderada e ocasional pseudoestratificação nuclear. O índice mitótico é variável. Tumores que apresentam atipia nuclear e proliferação acentuadas são chamados de tumor mucinoso borderline com carcinoma intraepitelial. Também podem conter áreas de microinvasão e/ou carcinoma microinvasor.

O prognóstico é excelente. Recorrência foi relatada em casos de cistectomia. Os raros casos de progressão relatados foram inadequadamente examinados e possivelmente continham áreas de carcinoma. Mesmo nos casos com carcinoma intraepitelial, a sobrevida é de 95-100%. Os raros casos de morte relatados não são confiáveis em relação à amostragem tumoral ou presença de tumor primário extra-ovariano. A presença de microinvasão está associada a 5% de recorrência e mortalidade inferior a 5%. A importância prognóstica do carcinoma microinvasor ainda é indefinida, devido a dados insuficientes (5,24).

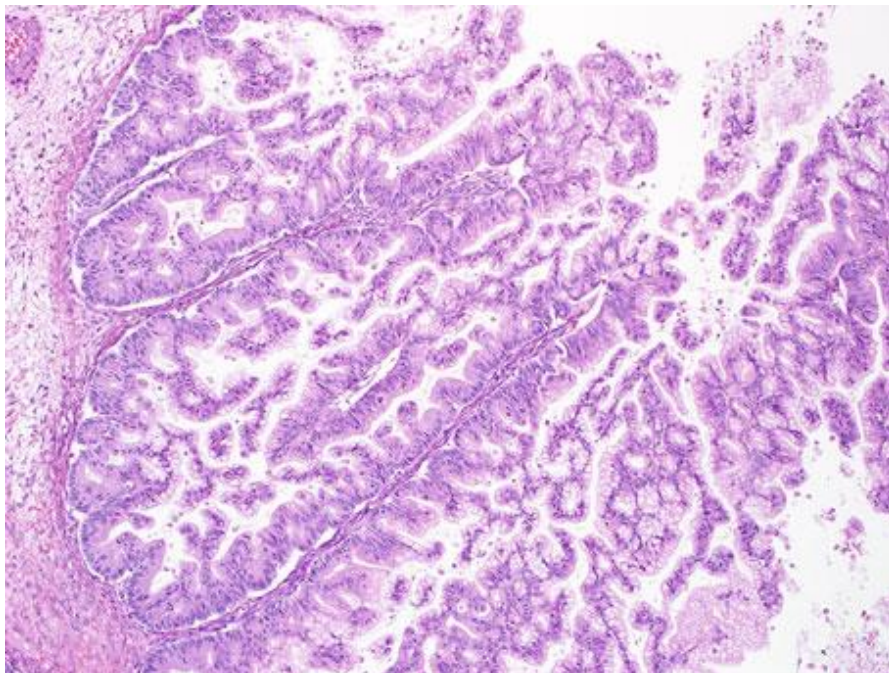


Figura 9 - Tumor mucinoso borderline. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

### 9.2.3. Carcinomas mucinosos

Correspondem a 3-4% dos carcinomas ovarianos primários. A idade média de diagnóstico é 45 anos. Os sintomas mais comuns são dor ou distensão abdominal e a maioria dos tumores está restrito ao ovário. Estágios avançados são muito raros.

Formam massas unilaterais, volumosas, com áreas císticas e sólidas. A maioria dos casos não exhibe envolvimento da superfície externa, mas tumores muito grandes podem se romper ou formar adesões.

Exibem dois padrões de invasão, que podem coexistir no mesmo tumor. O padrão expansivo é caracterizado por aglomeração de glândulas sem estroma interveniente, gerando um aspecto semelhante a um labirinto, ou cribriforme. O padrão destrutivo estromal é menos comum, exibindo glândulas, ninhos e células isoladas irregulares com citologia maligna, infiltrando o estroma. A presença do padrão infiltrativo, particularmente em casos bilaterais, deve levantar a suspeita de metástase e investigação de sítio extra-ovariano. O índice mitótico é elevado, com figuras de mitose atípicas. Citologicamente, as células são mucinosas, com atipia nuclear moderada a acentuada e pleomorfismo. A heterogeneidade intratumoral é comum, encontrando-se áreas benignas e borderline. Alguns autores gradua as lesões em baixo e alto grau, utilizando os mesmos critérios do carcinoma seroso. Contudo, a classificação da OMS não contempla essa divisão.

A maioria dos tumores está confinada a um ovário no diagnóstico, com sobrevida de 90%. A presença de invasão destrutiva está associada a piores prognósticos. A recorrência é precoce, em menos de 3 anos após o diagnóstico. A maioria das pacientes com doença extra-ovariana no diagnóstico inicial morre devido à doença (5,24).

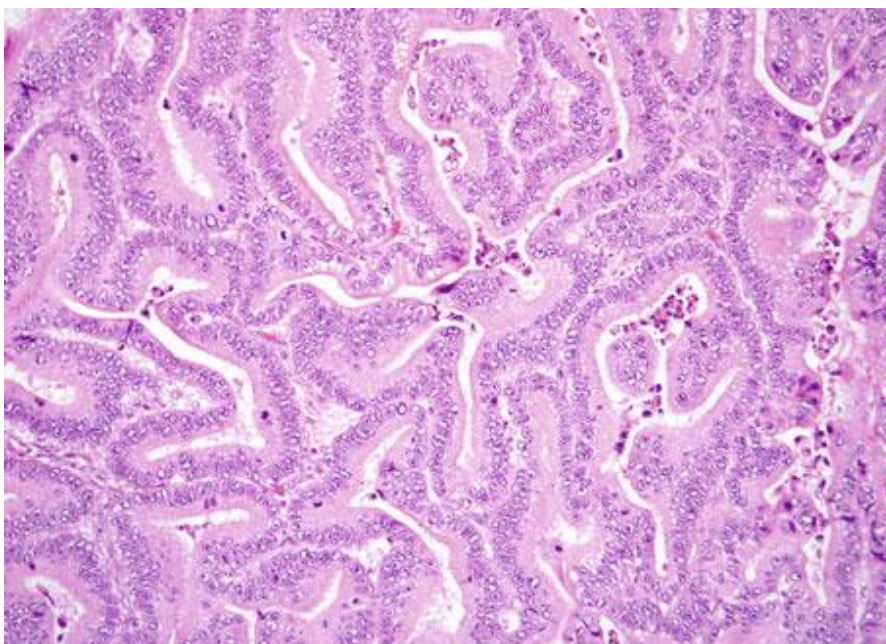


Figura 10 - Carcinoma mucinoso. Fonte: Kurman, R; 2011(5)

### 9.3. Tumores endometrioides

Neoplasias epiteliais ovarianas contendo epitélio endometrial/endometrioide.

#### 9.3.1. Cistos endometrioides/endometriomas

São formas císticas de endometriose no ovário. O sintoma mais comum é dor, devido ao efeito de massa do cisto. Geralmente estão associados a endometriose em outros locais, o que pode causar infertilidade. Medem até 15 cm de diâmetro, mostrando revestimento interno irregular e áreas hemorrágicas. O conteúdo é marrom-escuro, levando ao aspecto clássico de “cisto de chocolate”. Na microscopia, são revestidos por epitélio endometrial sobrejacente a estroma endometrial. O epitélio pode mostrar atipia nuclear, macronucleose e hiper cromasia acentuados. Hemorragia, macrófagos com hemossiderina e fibrose são frequentes. Seu comportamento é benigno. Ocasionalmente sofrem transformação maligna (5,24).

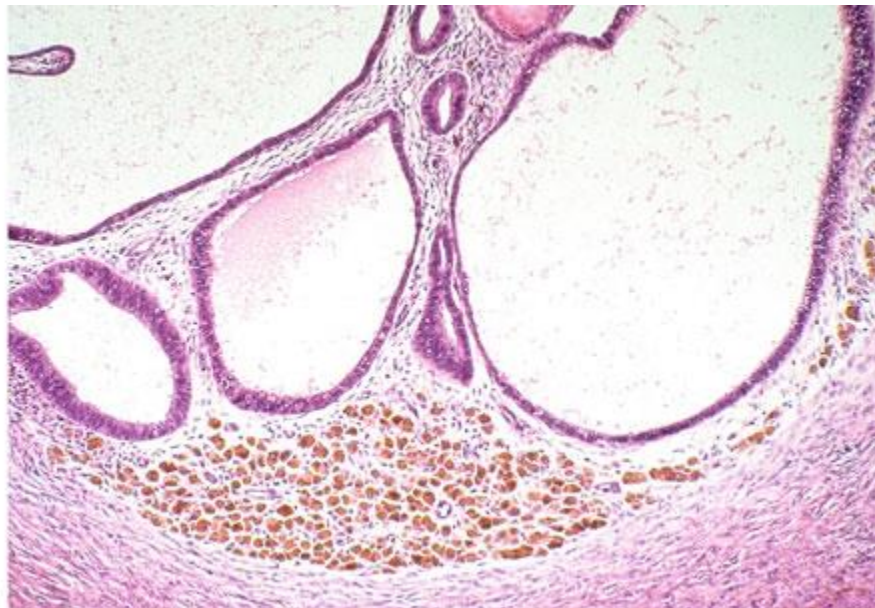


Figura 11 - Cisto endometriode. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

#### 9.3.2. Tumores endometrioides benignos

São lesões muito raras e provavelmente correspondem a endometriomas cujo estroma endometrial não foi visualizado. A idade média de diagnóstico é de 55 anos. Os sintomas são inespecíficos, podendo apresentar dor aguda devido a torção. Geralmente são unilaterais. Cistoadenomas são císticos, uni ou multiloculados, com

revestimento interno hemorrágico. Adenofibromas tem tamanho médio de 10 cm, são sólidos com áreas císticas, com aspecto de favo de mel. Ambas as lesões normalmente estão associadas com endometriomas e endometriose extra-ovariana.

Microscopicamente, se diferenciam de endometriomas pela ausência de estroma endometrial. Cistoadenomas são císticos, revestidos por epitélio endometriode. Adenofibromas possuem estroma fibroso proeminente com glândulas endometrioides tubulares ou císticas. Citologicamente, o epitélio é colunar, com núcleos ovoides e nucléolos inconspícuos. Frequentemente são ciliados, lembrando epitélio tubário. Seu comportamento é benigno (5,24).

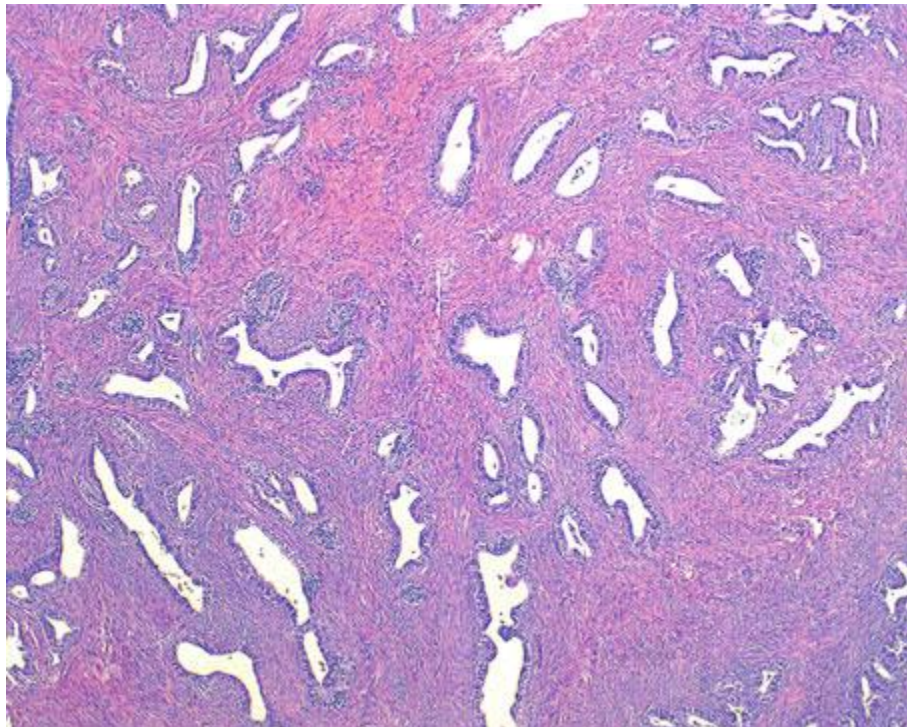


Figura 12 - Adenofibroma endometriode. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

### **9.3.3. Tumores endometrioides borderline/tumores endometrioides proliferativos atípicos**

São incomuns, constituindo apenas 0,2% dos tumores epiteliais ovarianos. A idade média do diagnóstico é de 51 anos. O sintoma mais comum é massa pélvica. A maioria dos pacientes tem endometriose associada. A presença de hiperplasia ou carcinoma no endométrio também é comum (39%). São predominantemente unilaterais, com tamanho médio de 9 cm. Tipicamente são sólidos, com estroma

fibromatoso denso. Quando são císticos, mostram revestimento interno friável e conteúdo hemorrágico.

Exibem dois padrões de crescimento. O padrão adenofibromatoso é análogo à hiperplasia endometrial atípica. Caracteriza-se por proliferação glandular endometriode com aglomeração glandular sem estroma interveniente, podendo formar um padrão cribriforme, em meio a estroma fibroso denso. O padrão intracístico tem o mesmo aspecto, mas se apresenta como prostrusão na superfície interna de um cisto. Citologicamente, a atipia nuclear é leve a moderada, além de exibir estratificação epitelial. A presença de atipia citológica acentuada modifica o diagnóstico para carcinoma endometriode intraepitelial. Pode conter áreas de microinvasão.

O prognóstico é excelente, não sendo observado comportamento maligno. A microinvasão e o carcinoma intraepitelial aparentemente não afetam o prognóstico, mas devido à raridade desses tumores, existem poucos casos relatados (5,24).

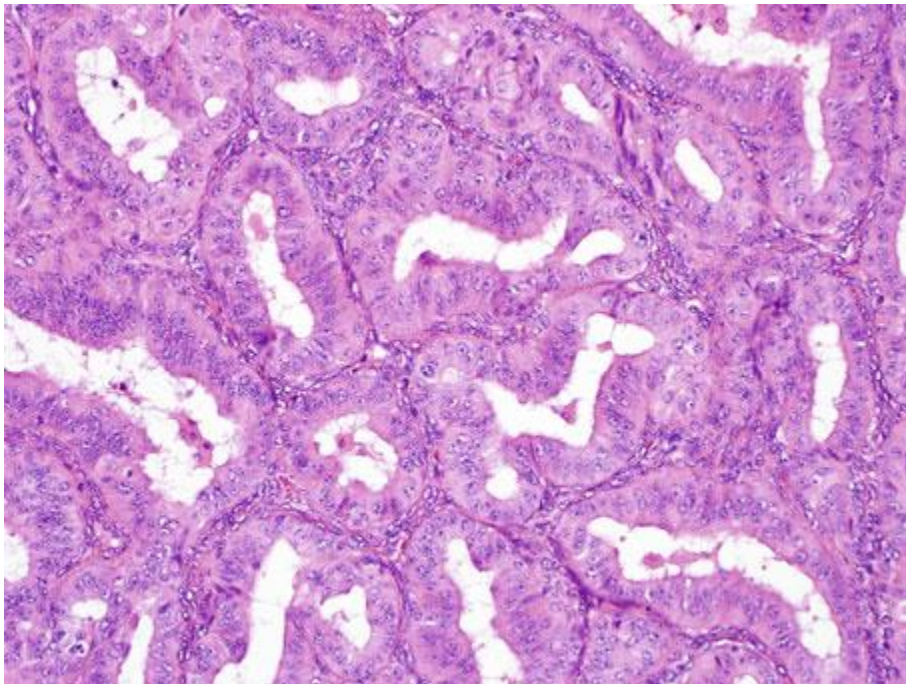


Figura 13 - Tumor endometriode borderline. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)



#### **9.3.4. Carcinomas endometrioides**

Correspondem a 10-15% dos carcinomas ovarianos, sendo a segunda neoplasia maligna mais comum. A idade média do diagnóstico é de 58 anos. A maioria é assintomática, mas o sintoma mais comum é massa pélvica. A maioria das lesões é unilateral e confinada ao ovário. 42% dos tumores são associados com endometriose e 15 a 20% coexistem com carcinoma endometrial. Essa associação sugere que ambos podem compartilhar os mesmos fatores de risco. Apresentam tamanho médio é de 15 cm, com superfície externa lisa. A superfície de corte exhibe massas ou papilas friáveis, com conteúdo sanguinolento. Podem ser totalmente sólidos, com necrose e hemorragia. Caso tenham surgido de um cisto endometriode, formam nódulo polipoide que se projeta na luz de cisto preenchido por sangue.

Exibem similaridades com carcinomas endometrioides do corpo uterino. Formam glândulas confluentes sem estroma interveniente, padrões cribriformes, viloglandulares, glândulas ovais ou tubulares. Menos frequentemente, exibem crescimento destrutivo de glândulas desorganizadas infiltrando o estroma e causando desmoplasia. Citologicamente, o epitélio é estratificado com margens luminais bem delimitadas. São graduados como carcinomas endometriais em G1, G2 e G3, de acordo com a presença de áreas sólidas e o grau de atipia nuclear. Alguns autores utilizam o método binário de baixo e alto grau. 30% a 50% dos casos mostram áreas de diferenciação escamosa. Também podem apresentar áreas de alteração secretora e padrões que simulam a arquitetura de neoplasias estromais. Quando também há carcinoma no endométrio, a distinção entre duas neoplasias independentes ou metástase é feita com base em critérios clínicos. De acordo com o estágio inicial, a sobrevida em 5 anos é: estágio I, 78%; estágio II, 63%; estágio III, 24%; estágio IV, 6%. Tumores G3 tem pior prognóstico. Áreas de diferenciação escamosa não afetam o prognóstico (5,24).

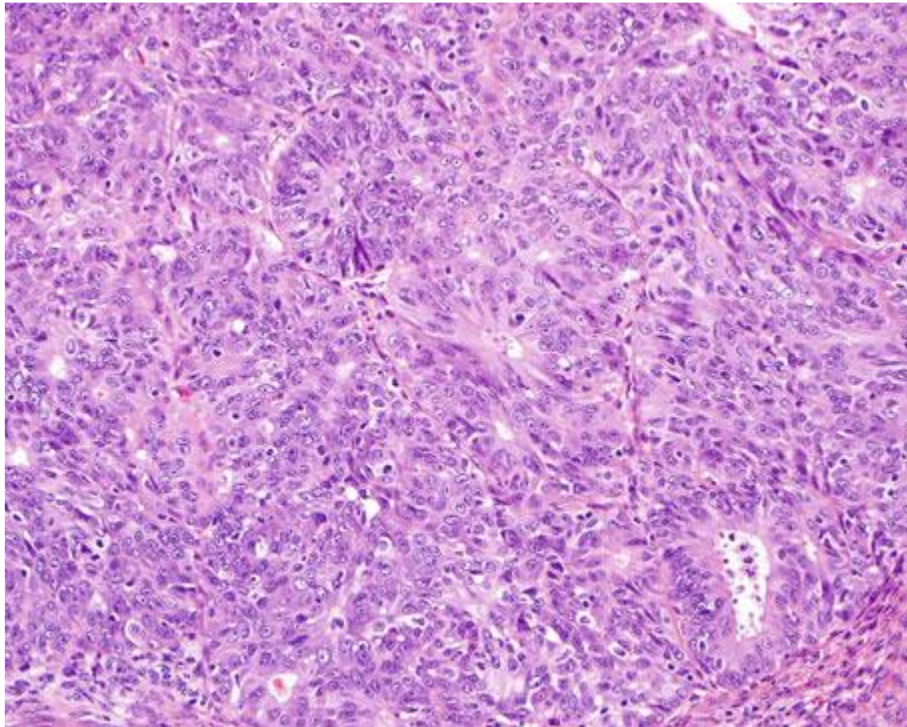


Figura 14 - Carcinoma endometriode de alto grau/G3. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

#### **9.4. Tumores de células claras**

Tumores epiteliais ovarianos contendo células claras: células cuboidais ou achatadas com citoplasma claro ou eosinofílico.

##### **9.4.1. Tumores de células claras benignos**

São muito raros, com poucos casos descritos na literatura. Podem ser achados incidentais ou exibirem sintomas inespecíficos. Adenofibromas formam massas sólidas com diâmetro entre 3-16 cm e possuem superfície externa lobulada e lisa. A superfície de corte exhibe pequenos cistos. Histologicamente, contém glândulas simples, dilatadas e espaçadas entre si, num estroma fibromatoso. Citologicamente, o epitélio é cuboidal ou achatado, com citoplasma claro ou eosinofílico. O epitélio e o estroma tem núcleos brandos. Mitoses são raras ou ausentes. Devido à sua raridade, esse diagnóstico só deve ser feito após extensa amostragem e exclusão de tumor borderline ou carcinoma. Cistoadenomas são mais raros, sendo císticos e seu revestimento epitelial geralmente é achatado, devido à compressão. Possuem comportamento benigno (5,24).

#### **9.4.2. Tumores de células claras borderline/tumores de células claras proliferativos atípicos**

Correspondem a menos de 1% de todos os tumores borderline. A idade média de diagnóstico é 59-68 anos e quase todas as pacientes são pós-menopáusicas. O sintoma mais comum é massa ou aumento abdominal. Todos são confinados ao ovário e quase todos são unilaterais. Apresentam tamanho médio de 6 cm. Ao corte, são sólidos com pequenos cistos. Na microscopia, veem-se glândulas arredondadas ou ovais, espaçadas entre si, num estroma fibromatoso. Citologicamente, o epitélio é composto de células claras estratificadas que podem formar um padrão característico de “hobnail”. Também são vistas células neoplásicas soltas na luz das glândulas. A atipia nuclear é moderada. Mitoses são raras. Frequentemente estão associados com endometriose. Todos os casos documentados mostram comportamento benigno (5,24).

#### **9.4.3. Carcinomas de células claras**

São os tumores ovarianos mais associados com endometriose, surgindo dela em 50-70% dos casos. A idade média de diagnóstico é 54 anos. Os sintomas mais comuns são massa ou distensão abdominal. Geralmente são unilaterais, com tamanho médio de 15 cm. Podem ser sólidos, sólido-císticos ou císticos com áreas nodulares.

Exibem uma mistura de padrões sólidos, papilares e tubulocísticos. Citologicamente, as células variam de achatadas a cuboidais ou poligonais, enquanto o citoplasma é claro ou eosinofílico e os núcleos são hipercromáticos, excêntricos e com nucléolos evidentes. A maioria dos tumores contém “hobnail cells”, que são células com núcleos apicais hipercromáticos. As áreas sólidas são compostas por lençóis de células poliédricas separadas por septos finos. Os túbulos e cistos contêm secreções eosinofílicas. As papilas geralmente são pequenas e regulares. Todos os carcinomas de células claras são considerados de alto grau. O fator prognóstico mais

importante é o estágio inicial, sendo ótimo em IA. Doença em estágios avançados tem má-resposta à quimioterapia, levando a baixa sobrevida (5,24)

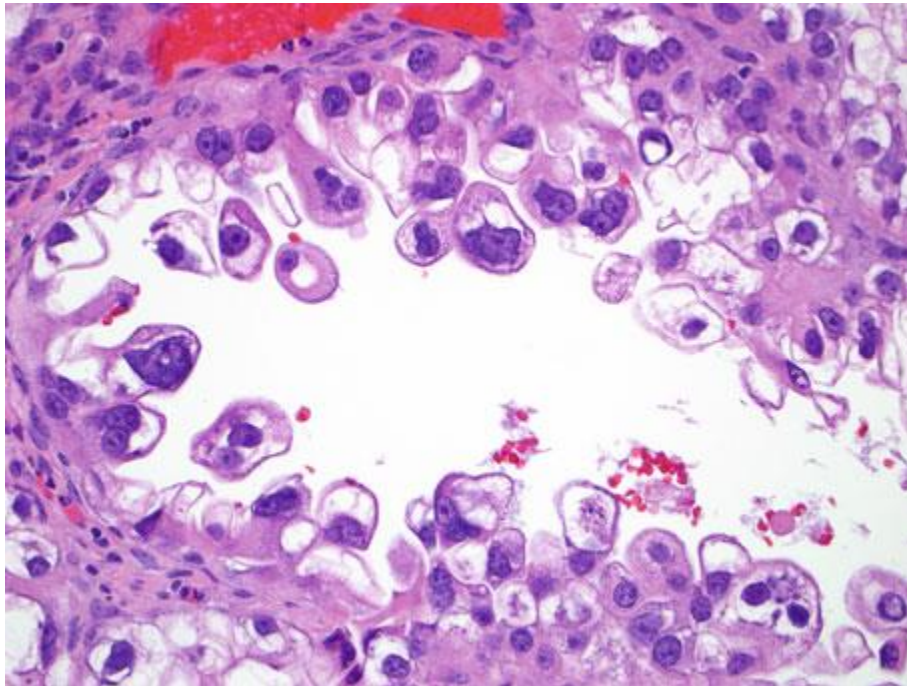


Figura 15 - Carcinoma de células claras. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

### **9.5. Tumores de Brenner/transicionais**

Tumores epiteliais ovarianos compostos de células de tipo transicional semelhantes ao urotélio.

#### **9.5.1. Tumores de Brenner**

Correspondem a cerca de 5% de todos os tumores epiteliais ovarianos benignos. A idade média de diagnóstico é 56 anos. A maioria é assintomática e identificada como achado ocasional em ovários removidos por outras razões. Cerca de 25% são associados com outros tumores epiteliais, geralmente mucinoso. Dependendo do tamanho, podem causar dor e aumento abdominal. Se possuem estroma funcionante, geram sintomas endócrinos. Normalmente tem menos de 2 cm, raramente excedendo 10 cm. 90% são unilaterais. São sólidos e bem circunscritos, com superfície de corte cinzenta ou amarelada, com pequenos cistos. Histologicamente, exibem ninhos ovais ou irregulares de epitélio transicional num estroma fibromatoso proeminente. Os ninhos podem ser sólidos ou exibir cavidades. Citologicamente, o epitélio é poliédrico a alongado, com citoplasma claro e núcleos

ovoides sem atipia. Mitoses são raras. Frequentemente são encontradas áreas de metaplasia mucinosa. Possuem comportamento benigno (5,24).

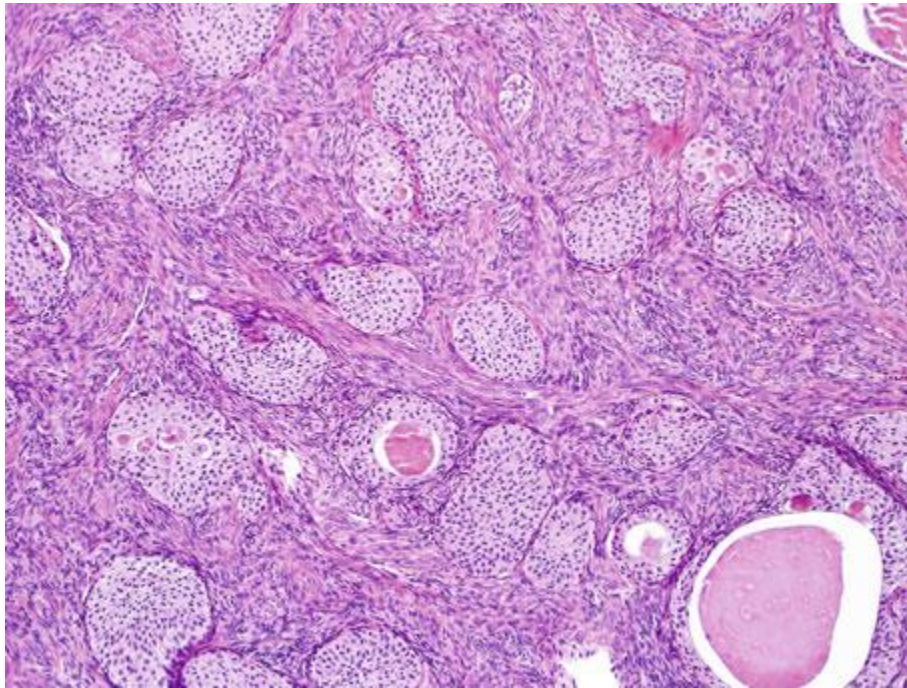


Figura 16 - Tumor de Brenner. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

#### **9.5.2. Tumores de Brenner borderline/tumores de Brenner proliferativos atípicos**

São tumores raros. A idade média de diagnóstico é 59 anos. O sintoma mais comum é massa pélvica. São unilaterais e restritos ao ovário. Geralmente císticos e grandes, medindo, em média, 18 cm. A superfície interna dos cistos mostra massas papilares e áreas sólidas. Raramente são completamente sólidos. Na microscopia, o componente papilar tem semelhanças com carcinomas uroteliais de baixo grau não-invasores do trato urinário. Citologicamente, são semelhantes aos tumores de Brenner benignos. Quase sempre são encontrados tumor de Brenner benigno e áreas de metaplasia mucinosa. A presença de atipia nuclear de alto grau classifica a lesão como tumor de Brenner borderline com carcinoma intraepitelial. Seu comportamento é benigno, mas há relatos de recorrência (5,24).

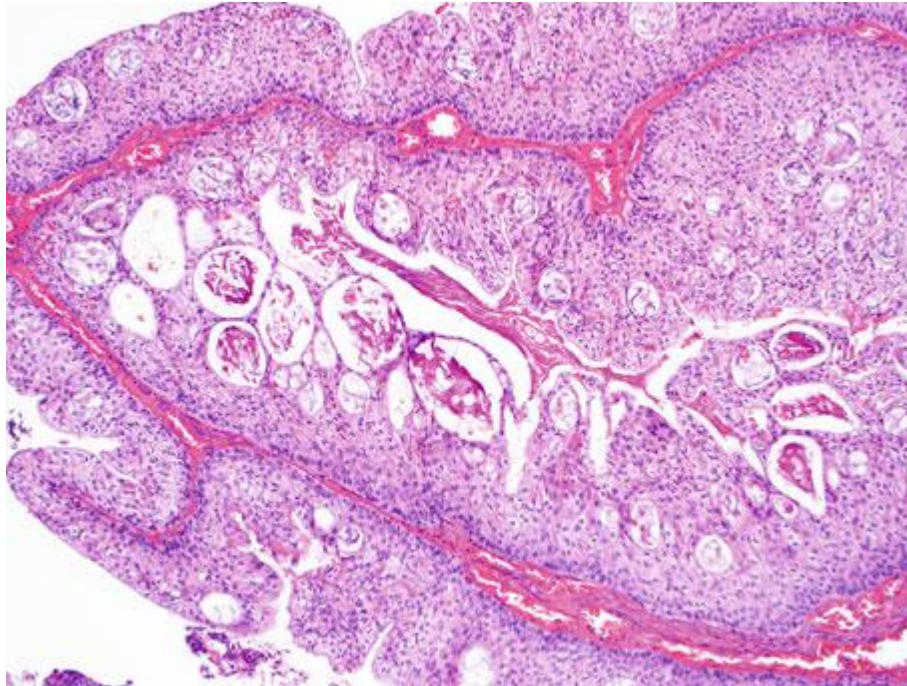


Figura 17 - Tumor de Brenner borderline. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

### 9.5.3. Tumores de Brenner malignos

Correspondem a menos de 5% dos tumores de Brenner. A idade média de diagnóstico é 63 anos. Os sintomas mais comuns são massa ou dor abdominal. 80% dos casos são restritos ao ovário e 12% são bilaterais. Geralmente são grandes, com tamanho médio de 16-20 cm. Podem ser sólidos ou císticos com nódulos sólidos. Microscopicamente, exibem massas irregulares de células transicionais ou,

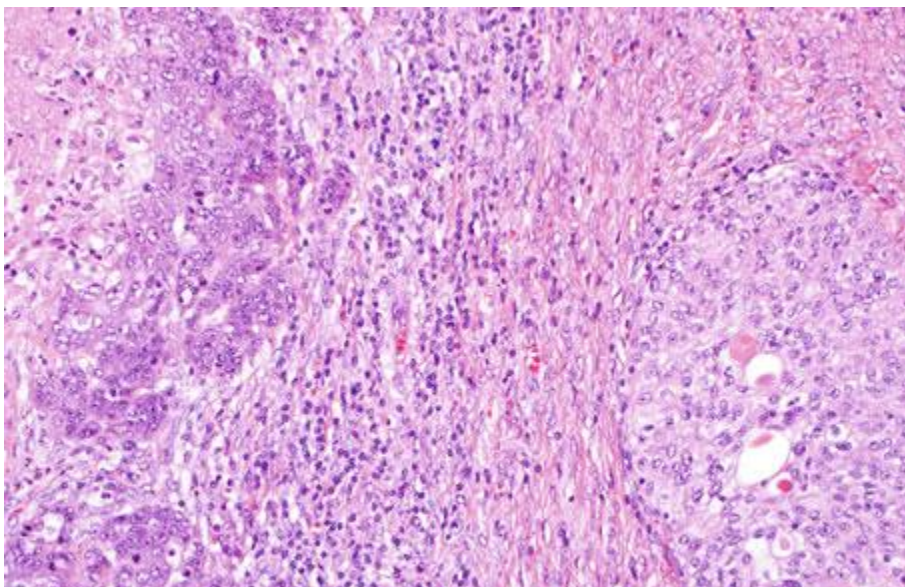


Figura 18 - Tumor de Brenner maligno. Fonte: Kurman, R; 2011 (5)

raramente, células escamosas. Os cistos são revestidos por epitélio transicional estratificado com núcleos hipercromáticos e pleomórficos. A atividade mitótica é alta. O estroma é densamente fibroso, tornando o diagnóstico de invasão difícil em alguns casos. Tipicamente também é encontrado tumor de Brenner benigno, além de metaplasia mucinosa. Seu comportamento depende do estágio, mostrando sobrevida em 5 anos de 88% no estágio IA. Quando há doença extra-ovariana, se comporta similarmente aos outros carcinomas ovarianos (5,24).

### **9.6. Tumores seromucinosos**

São tumores compostos por dois ou mais tipos de epitélio. Assim como os outros tipos histológicos, são divididos em benignos, borderline e carcinomas. São muito raros, com poucos casos relatados, mas parecem obedecer o padrão de comportamento dos outros tipos histológicos (5,24)

### **9.7. Carcinomas indiferenciados**

São tumores epiteliais malignos que não mostram diferenciação de nenhum tipo específico. São raros e a idade média do diagnóstico é de 55 anos, se apresentando em estágios avançados. Formam massas sólidas com necrose. Histologicamente, mostram lençóis, ninhos e cordões de células ovoides e monótonas com alto índice mitótico. São associados com carcinomas endometrioides de baixo grau, sugerindo uma possível progressão. Seu comportamento é altamente agressivo (5,24).

## **10. Carcinogênese ovariana**

Diversas teorias tentam explicar a origem dos tumores epiteliais ovarianos. No passado, o uso de talco na região genital e a infecção pelo vírus da caxumba foram apontados como carcinogênicos, mas posteriormente descartados devido à ausência de evidências epidemiológicas. O uso de álcool e tabaco também foi proposto, mas apesar dos relatos associando o seu consumo com aumento do risco de carcinoma ovariano, não parecem estar envolvidos no surgimento das neoplasias. Outra hipótese afirmava que tumores epiteliais ovarianos seriam mesoteliomas, causados por agentes irritantes do mesotélio que penetrariam pelo trato genital inferior. Essa proposta era baseada nas similaridades entre alguns tumores ovarianos e mesoteliais e na observação de cistos contendo transição entre epitélio ovariano maligno e

mesotélio. Entretanto, não foram identificados agentes irritantes específicos do mesotélio, além de mesoteliomas e tumores epiteliais ovarianos possuírem perfis imuno-histoquímicos distintos (12).

Em 1972, Mahmoud Fathalla propôs a teoria da ovulação incessante. O autor observou que tumores ovarianos são raros em animais com ovulação intermitente e comuns em animais com ovulação constante. Em humanos, essa teoria explica a baixa incidência de tumores epiteliais em pacientes pré-púberes, com múltiplas gestações e o efeito protetor da anticoncepção oral. Experimentos em modelos animais, visando a transformação maligna das células da superfície ovariana, geram carcinomas (13,26). Culturas dessas células também geram carcinomas de baixo e alto grau. Segundo essa teoria, a ovulação causa destruição e reparo, gerando inflamação, que aliada a fatores locais e/ou hormônios, causam invaginação, cistificação e metaplasia do mesotélio, resultando nos diversos tipos histológicos observados. Posteriormente esses cistos sofrem transformações malignas, resultando em carcinomas (27). Observa-se associação entre uso de gonadotrofinas para tratamento da infertilidade e o aumento de seus níveis séricos pós-menopausa com maior risco de carcinoma ovariano. Isso demonstraria como a estimulação do epitélio superficial pode estar relacionado à gênese desses tumores (28,29). Para um tecido ter capacidade metaplásica, precisa reter características de células tronco. O mesotélio demonstra marcadores desse potencial, como NANOG. Além disso, células com metaplasia tubária expressam marcadores imuno-histoquímicos semelhantes à tuba uterina, como E-caderina, Epcam, anti-cílios e OVGP1. Também são observados cistos com revestimento misto (mesotélio e epitélio tubário), o que favorece sua origem mesotelial, visto que metaplasia mesotelial do epitélio tubário é um evento improvável. Cistos mesoteliais com alterações displásicas são relatados, principalmente em portadoras de mutação de BRCA1. Esses também exibem alterações pré-neoplásicas como expressão aumentada de p53, perda da membrana basal, aumento de fatores antiapoptóticos e resposta alterada a hormônios e fatores de crescimento. Contudo, sua raridade é vista como indicação que não seriam a verdadeira origem (11,12,30).



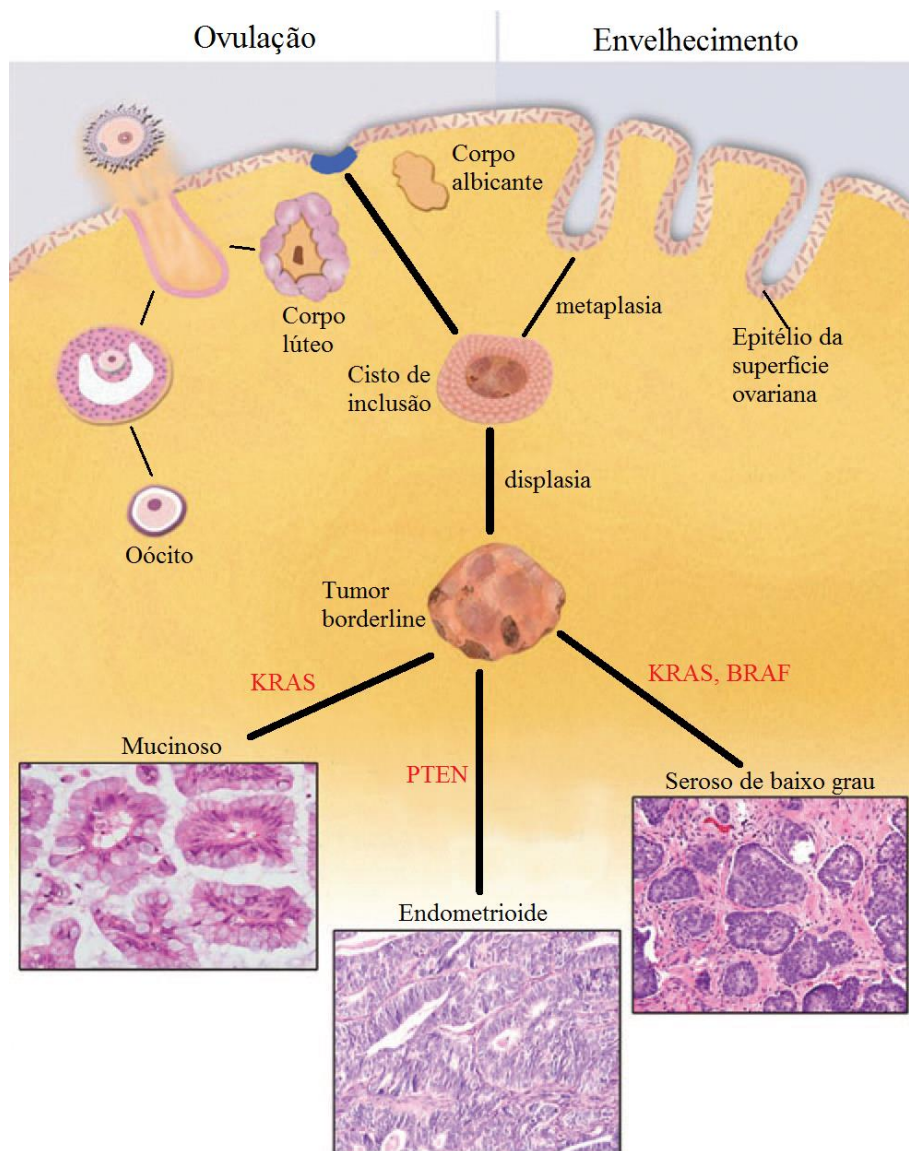


Figura 19 - Teoria da ovulação incessante. Fonte: modificado de Levanon, K; 2008 (95)

Alguns autores citam uma origem embriológica distinta da tuba uterina e do mesotélio ovariano como evidência que o último não poderia sofrer metaplasia tubária. Entretanto, N. Auersperg afirma que ambos tem origem embriológica comum. Outras críticas a esse modelo questionam a raridade de carcinomas serosos de alto grau em estágios precoces, apesar de ser o mais prevalente. Isso seria explicado por fatores do microambiente ovariano que estimulam uma rápida proliferação. Dessa maneira, as lesões são raramente detectadas devido ao curto tempo de sua existência antes de se transformarem em carcinomas de alto grau. Outro questionamento aponta que o mesotélio da superfície ovariana não tem semelhança com o epitélio dos tumores

no parênquima, inclusive imuno-histoquimicamente. O marcador PAX8 é expresso em carcinomas serosos, mas não no mesotélio, enquanto a calretinina é expressa no mesotélio, mas não em carcinomas. Outros estudos justificam esse fato ao demonstrar que o mesotélio, quando se invagina e forma cistos, perde a expressão de marcadores mesenquimais e expressa marcadores epiteliais. Comumente são encontrados cistos de inclusão com epitélio tubário. Entretanto, não há explicação para a inexistência de cistos de inclusão revestidos por epitélio mucinoso ou transicional, que dariam origem a tumores mucinosos e de Brenner (11,12,30–33).

A proposta que predomina na literatura atual, sendo uma das mais recentes, é a teoria da origem tubária. Essa hipótese foi formulada a partir do achado de alterações displásicas, neoplásicas e imuno-histoquímicas nas tubas de portadoras de mutação em BRCA1/2 submetidas a salpingooforectomias profiláticas (34). A tuba uterina seria o sítio de origem dos tumores epiteliais, através da implantação de células epiteliais tubárias no ovário, durante a ovulação. As neoplasias são divididas em dois grupos: tipo 1 e tipo 2, cada um com origens, características histológicas, imuno-histoquímicas, moleculares e clínicas distintas (11,12,26,27,35–38).

Os tumores de tipo 1 compreendem os carcinomas serosos e endometrioides de baixo grau, mucinosos, transicionais e de células claras. Esses tumores geralmente possuem comportamento indolente e estão restritos ao ovário. Compartilham um contínuo morfológico com seus tumores benignos correspondentes, progredindo de maneira paralela à sequência adenoma - carcinoma do cólon, na seguinte ordem: adenoma – tumor borderline – carcinoma. Os tumores serosos de baixo grau possuem uma lesão tubária precursora chamada de hiperplasia tubária papilar (PTH), causada por inflamação crônica do epitélio. PTH's são frequentemente encontradas em associação com tumores de baixo grau e exibem características semelhantes. Essas células descamam e se implantam no ovário durante a ovulação. Progressivas mutações de KRAS, BRAF, ERBB2 e perda de estabilidade genética levam ao surgimento de tumores, na sequência descrita acima. Em contraste com os tumores de alto grau, raramente tem mutações de TP53 ou BRCA (39). Também se acredita que o epitélio tubário normal possa descamar, implantar-se no ovário e originar tumores serosos de baixo grau (27). Os carcinomas endometrioides de baixo grau e de células claras são originados na endometriose ovariana, surgida da implantação de células endometriais no ovário pela menstruação retrógrada. As principais

alterações descritas são mutações do PTEN. Essa proposta sustenta-se em estudos que demonstram mutações do PTEN semelhantes na endometriose e em carcinomas endometrioides do mesmo ovário. Modelos animais com deleção desse gene desenvolvem carcinomas endometrioides (28,33). Também é relatada ativação de vias oncogênicas no endométrio de mulheres com endometriose (teoricamente permitindo sua disseminação e proliferação). O efeito protetor da ligadura tubária (impedindo a menstruação retrógrada) também contribui para essa explicação (19). Os tumores mucinosos e transicionais originam-se nos restos de Walthard (compostos por epitélio transicional benigno). Essas estruturas surgem de células epiteliais tubárias que se implantam no ovário e sofrem metaplasia transicional (40). Os achados a favor dessa afirmação são a ausência de fenótipo mülleriano desses tumores (não indicando origem comum com outros tipos histológicos) e a historicamente conhecida coexistência entre tumores de Brenner e mucinosos (11,12,28,31,41).

Os tumores de tipo 2 incluem carcinomas serosos e endometrioides de alto grau, carcinomas indiferenciados e carcinossarcomas, com vários casos exibindo sobreposição de características histológicas. Geralmente se apresentam em estágios avançados, com evolução rápida e agressiva. Possuem altas taxas de mutação de TP53 (80%), BRCA (40-50%) e amplificação de CCNE1 (31%), mas apenas raramente tem mutação nos genes alterados nos tumores de tipo 1 (27,39,42). Sua patogênese inicia com dano no DNA do epitélio tubário de tipo secretor, seguido por mutação do TP53, indicando uma desregulação precoce do ciclo celular. Duas lesões precursoras são descritas: a primeira é composta por pequenas expansões das células secretoras, chamada de excrecência de células secretoras ("secretory cell outgrowth" - SCOUT). A segunda é a assinatura de p53 ("p53 signature"), caracterizada por superexpressão imuno-histoquímica de p53. Foi proposto que SCOUT's dão origem às assinaturas de p53 ou que ambas são a mesma entidade com diferença na expressão de p53 (27,28). A assinatura de p53 exhibe mutações de TP53 em 57% dos casos, sendo encontrada (geralmente nas fímbrias) de pacientes com carcinoma seroso intraepitelial tubário e em tubas sem lesão neoplásica (34). A continuidade da perda de controle do ciclo celular culmina no surgimento do carcinoma seroso intraepitelial tubário (STIC). O microambiente da tuba não permite que essas lesões invadam o estroma, impedindo sua transformação em carcinomas

tubários invasores. Posteriormente, durante a ovulação, células tubárias neoplásicas sofrem descamação e se implantam na superfície ovariana. Nesse microambiente propício, proliferam, resultando em carcinomas de alto grau, sem a sequência progressiva observada no tipo 1. O principal argumento de defesa dessa teoria é o envolvimento tubário (incluindo STIC's) em 50-60% dos casos de carcinoma seroso de alto grau não-hereditário. Adicionalmente, ambos carcinomas serosos de alto grau e STIC's compartilham a mesma morfologia, mutações de TP53, superexpressão de p53 e ciclina E1 (11,12,27,28,31,43–47).

Existem quatro hipóteses para justificar os 40-50% de carcinomas serosos de alto grau sem envolvimento da mucosa tubária: a primeira diz que alguns carcinomas serosos de alto grau podem surgir de tumores de baixo grau. Em alguns casos, CSAG coexistem com carcinomas de baixo grau e tumores “borderline”. Esses tumores de alto grau demonstram KRAS e TP53 de tipo selvagem, semelhante aos CSBG, levando à hipótese que surgiram dos últimos; a segunda teoria propõe que cistos corticais derivados da implantação de epitélio tubário normal no ovário durante a ovulação, com posterior cistificação, sofrem mutação do TP53 e malignização. Esses cistos são revestidos por epitélio tubário e encontrados somente em pacientes pós-menarca, enquanto os revestidos por mesotélio são relatados pré-menarca. Também mostram prevalência diretamente proporcional à idade, além de possuírem uma população de leucócitos semelhante à da tuba uterina (27,43,45); a terceira explicação são STIC's não detectados devido ao corte histológico, mesmo com a realização de protocolo de inclusão total da tuba uterina; a quarta hipótese propõe que o crescimento excessivo do carcinoma impossibilita a distinção das camadas da tuba, impedindo a identificação de envolvimento mucoso (11,12,31).

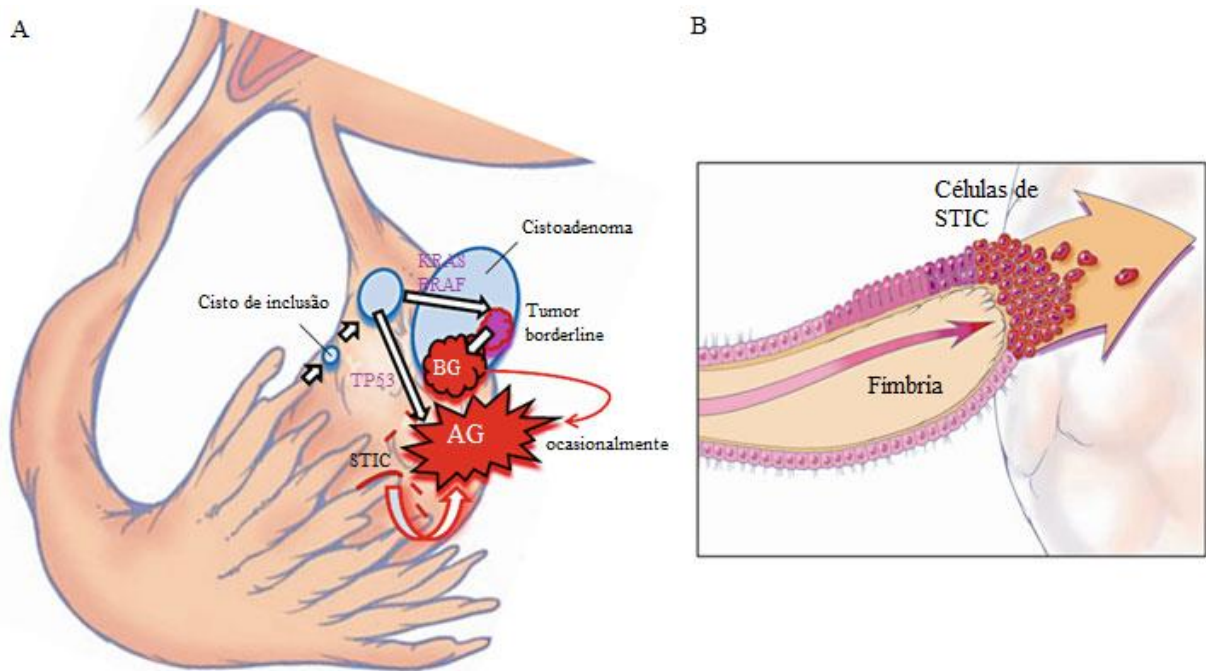


Figura 20 - Teoria da origem tubária

A: Vias carcinogênicas de tipo 1 e tipo 2

B: Tipo 2: células neoplásicas tubárias sendo implantadas no ovário

Fonte: modificado de Kurman, R; 2011 (5)

Há questionamentos sobre a validade desse modelo. Enquanto a maioria dos carcinomas tubários (70%) é diagnosticada nos estágios I ou II, carcinomas ovarianos são diagnosticados predominantemente nos estágios III e IV. Não faz sentido que lesões tubárias invasoras não exibam envolvimento pélvico ou metástase a distância, enquanto lesões tubárias intraepiteliais levam a carcinomas ovarianos com disseminação pélvica e metástase (30). Outra pergunta utiliza a doença inflamatória pélvica como referência. Nessa doença, bactérias atravessam a tuba uterina e atingem a pelve, por efeito gravitacional, gerando inflamação nessa região. Como já mencionado, a maioria dos carcinomas ovarianos se apresenta em estágio III-IV, o que significa envolvimento abdominal. Não há explicação para o porquê de as células neoplásicas tubárias aparentemente desafiarem a gravidade e atingirem superfícies acima da tuba uterina e ovário. Também é indagado como uma via tumorigênica única pode gerar a enorme variabilidade morfológica vista nos tumores epiteliais, mesmo naqueles de mesmo grau de malignidade e tipo histológico (12,33).

Elvio Silva propõe a teoria “fere ex nihilo”. Segundo sua hipótese, todas as neoplasias ovarianas surgem a partir de células primitivas, mesenquimais ou epiteliais precoces sem características distintas, ou seja, surgidas quase do nada (“fere ex nihilo”). O surgimento dos tumores epiteliais envolve as seguintes alterações: células tronco e mesenquimais dão origem às lesões benignas; hormônios influenciam o comportamento dos tumores, através de sua ação em células ovarianas estromais, que por sua vez induzem proliferação epitelial (o autor cita como exemplo as diferenças encontradas entre tumores semelhantes em gestantes e em modelos animais submetidos a ações hormonais); os tumores tem origem multicêntrica, o que esclarece situações como a presença de carcinoma intraepitelial na tuba de um lado e carcinoma apenas na superfície do ovário contralateral (12).

## **11. O ciclo celular**

As células eucarióticas crescem e se dividem através de um ciclo celular dividido em duas partes: mitose e interfase. Durante a mitose, os cromossomos se separam entre as duas células-filhas, culminando na divisão celular. Após a mitose, a célula tem duas vias a seguir: a primeira, encontrada na maioria das células humanas adultas, é o período de quiescência (G0), onde não há crescimento celular ou replicação do DNA. Esse estado é mantido pelo efeito repressor da proteína pRb. A segunda via disponível é seguir pelas três fases habituais da interfase (G1, S e G2), para um novo ciclo de divisão celular (48–51).

Uma célula sob a influência de fatores de crescimento progride para G1 (gap 1). Nessa fase ocorre duplicação de todos os componentes (RNA, proteínas, lipídios e carboidratos), exceto o DNA. Para que o ciclo celular progrida, a maquinaria celular precisa inativar a repressão realizada por pRb. Estímulos mitogênicos levam à transcrição de ciclinas, formando fatores de promoção da maturação (MPF's), dímeros constituídos por uma ciclina e uma quinase dependente de ciclina (cdk). Isoladas, as cdk's são inativas, sendo ativadas quando formam o complexo com uma ciclina. A passagem de G1 para S é dependente de dois MPF's. O primeiro é constituído pela ciclina D e por cdk4/6. Sua quantidade aumenta progressivamente durante G1, até que seja maior do que seus inibidores, quando consegue exercer sua função principal de fosforilar pRb, permitindo a ativação de fatores de transcrição. Entre os produtos dessa transcrição está a ciclina E, que forma o dímero ciclina E-cdk2, que age nos

períodos central e final de G1. Sua principal função é amplificar a fosforilação inicial de pRb, além de começar a formação do complexo de pré-replicação na fita de DNA, efetivamente iniciando a fase S (síntese). Na síntese, há atividade da ciclina A, que substitui a ciclina E e forma o complexo ciclina A-cdk2, agindo ao completar a formação do complexo de pré-replicação. Posteriormente ocorre replicação do DNA. Quando S está completa, inicia-se G2. Ao contrário da transição G1-S, a passagem S-G2 não é bem demarcada e não possui ponto de controle, ocorrendo quando a replicação de DNA está completa. A passagem de G2 para M é regulada pelo complexo ciclina B-cdk1 (48–52).

Para que o ciclo celular avance de G1 para S, é imprescindível um tamanho celular mínimo e ausência de dano no DNA. Se alguma dessas condições ou estímulos oncogênicos está presente, o avanço do ciclo celular é interrompido. Se a célula consegue reparar o dano no DNA, o ciclo é retomado. Se não há correção, a célula progride para apoptose ou senescência permanente. O controle dessa progressão é feito por conjuntos de proteínas que agem sobre os complexos ciclina-cdk. Os fatores centrais no controle desse mecanismo são as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb. O outro grupo de supressores tumorais são as inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKI's), entre elas p16, p14 e p21. Se ocorrem mutações, sua função é perdida ou prejudicada, permitindo que células de tamanho inadequado e com DNA danificado repliquem, sendo uma das alterações mais encontradas em tumores (48,53).

O primeiro mecanismo de controle de G1-S é a via comandada por p53. Numa célula normal, p53 é constantemente degradado por MDM2, portanto tendo meia-vida muito curta. Na presença de dano no DNA, MDM2 é fosforilado, perdendo sua capacidade de degradar p53. Dessa maneira, p53 é estabilizado e há aumento de seus níveis, permitindo a realização de suas ações de ativação ou repressão de certos genes. De acordo com a extensão do dano no DNA, leva à parada do ciclo celular ou ativa a via da apoptose. Entre os genes estimulados por p53 estão: GADD45, que estimula reparo do DNA; RNA's longos não-codificantes (lincRNA's) e miRNA's, que inibem a transcrição; p21, que inibe a ciclina D. Também é estimulada a transcrição de MDM2, levando a um sistema de controle de p53 por feedback negativo (48).

O outro ponto de controle é chamado ponto de restrição, controlado por pRb. Esse é um momento crítico para a célula, pois a partir desse momento não há como evitar a replicação do DNA, independentemente de sinais externos. Assim como p53, responde a sinais sobre o crescimento celular e dano no DNA. Em seu estado habitual, pRb se encontra no citoplasma, ligado ao fator de transcrição E2F, impedindo sua ação. Para que ocorra progressão, pRb é fosforilado pelo complexo ciclina D-cdk2, o que causa sua dissociação de E2F. E2F livre penetra no núcleo, onde ativa a transcrição de diversos genes necessários para a entrada em S. Dentre eles, o gene do próprio E2F, levando a um feedback positivo e o da ciclina E, que, como já descrito, aumenta a fosforilação de pRb. A eliminação de pRb ou o contorno de seu mecanismo de controle através de outras proteínas é um dos mecanismos utilizados por células cancerígenas para proliferar inadequadamente (48,54).

A atividade das ciclinas também é controlada por um grupo de proteínas chamadas de inibidoras de quinases dependentes de ciclina (CKI's), dividido em duas famílias: CDKN2A, também conhecida como INK4, composta por p14, p15, p16, p18 e p19. Na presente revisão enfocamos apenas em p16 e p14. p16 é produto do gene CDKN2A, cuja transcrição é estimulada por dano no DNA. Inibe ciclina D-cdk4/6, assim bloqueando seu efeito negativo sobre a atividade de pRb e impedindo o avanço do ciclo celular. Também ativa a via da apoptose (55). Um aspecto interessante é que pRb inibe a transcrição de p16, modulando os níveis do primeiro. O outro produto de CDKN2A é p14, também é conhecido como ARF, por ser a proteína resultante da fase de leitura alternada ("alternate reading frame") do mesmo locus de p16(56). Apesar de compartilharem áreas codificantes, diferem em seu primeiro exon, resultando em leituras e polipeptídeos distintos (57). Sua transcrição é ativada por dano celular e estímulos oncogênicos (53,58–60). Também é transcrito por estímulo de E2F. Uma de suas ações é degradar E2F, bloqueando o avanço do ciclo, além de exercer um feedback negativo. Seu outro efeito é sequestrar MDM2 no nucléolo, impedindo que este degrade p53, permitindo que o último pare o avanço do ciclo celular (61–63). A outra família de CKI's é CIP/KIP, composta por p21, p27 e p57. Seu principal membro é p21, cuja transcrição é ativada por p53. Sua principal ação é se ligar a ciclina D-cdk4/6, impedindo que esse fosforile pRb (48,64).



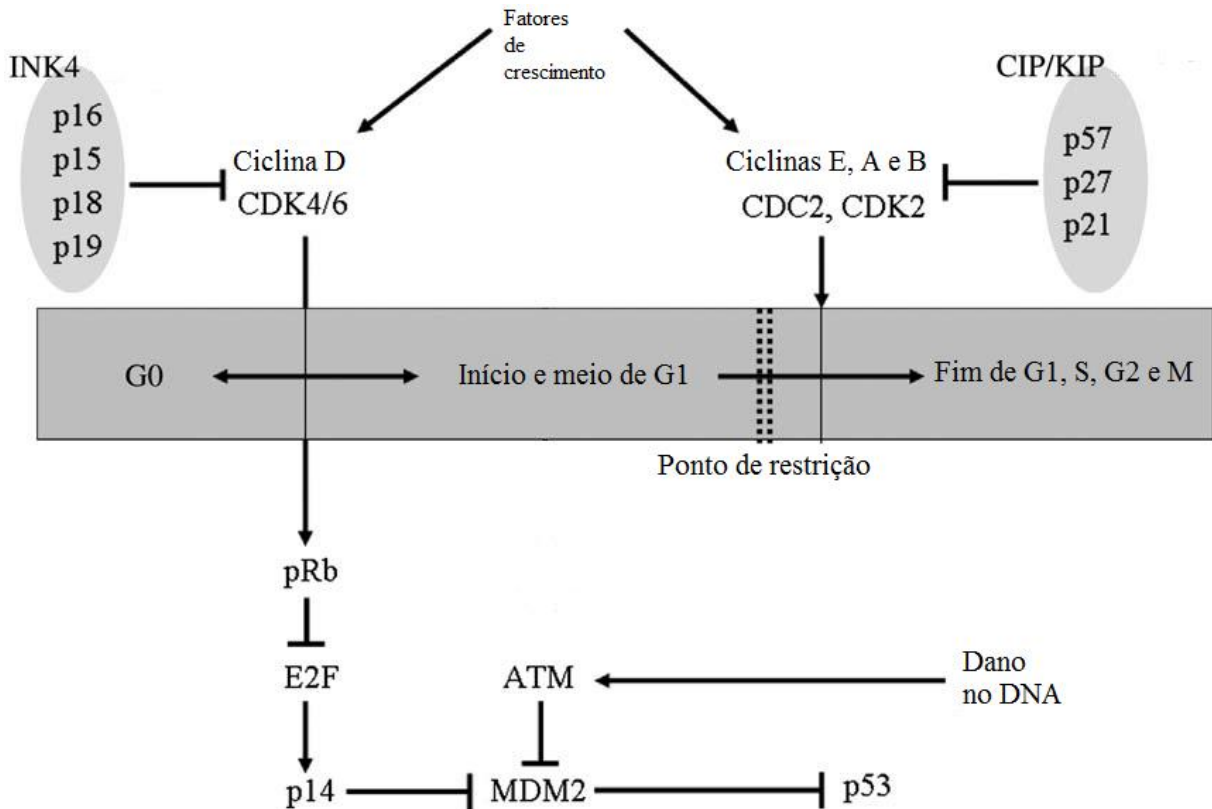


Figura 21 - Ciclo celular. Na figura estão destacadas as funções principais dos fatores atuantes no controle da passagem de G1 para S. Fonte: modificado de Nam, E J; 2008 (56)

## 12. Proteínas supressoras tumorais e neoplasias epiteliais ovarianas

Dentre os componentes do ciclo celular, a progressão além do ponto de restrição de G1 é visto como crucial no surgimento de células malignas, uma vez que a partir deste ponto, a célula obrigatoriamente realizará a duplicação de seu DNA. Portanto, alterações nas proteínas controladoras dessa progressão podem levar ao surgimento de células neoplásicas. Essas proteínas e seus genes codificantes são estudados em várias neoplasias, incluindo ovarianas, onde são encontradas associações entre mutações e diferenças de expressão imuno-histoquímica e variáveis clínico-patológicas. A seguir, expomos as informações disponíveis na literatura atual sobre as proteínas estudadas em nosso estudo, com enfoque em suas alterações na carcinogênese ovariana e imuno-histoquímica.

### 12.1. p53

O p53 é produto da transcrição do gene TP53 e tem função supressora tumoral responsiva a dano no DNA. A perda ou mutação de TP53 é uma das alterações mais

comuns no câncer, permitindo que as células tumorais evitem os mecanismos de parada do ciclo celular e/ou apoptose, continuando a replicação de DNA danificado (49,53). Na presença de mutação, os produtos do TP53 mutante são resistentes à degradação e são incapazes de ativar a transcrição de seu inibidor MDM2 (abolindo o feedback negativo), levando à expressão de altos níveis de p53, além de terem efeitos oncogênicos e estarem associados a maior resistência a quimioterápicos (56,63,65,66).

Mutações de TP53 e superexpressão de p53 estão associados com piores prognósticos em carcinomas uroteliais(63), o que também é observado em carcinomas tímicos. Adicionalmente, timomas não demonstram TP53 mutante (64). Em lesões cervicais, a infecção pelo HPV gera o oncogene E6, que se liga e degrada p53. Também são relatadas mutações em TP53. Alguns estudos mostram relação entre a expressão de p53 e o grau da lesão escamosa, enquanto outros não relatam associação. Também são contraditórios os achados sobre seu valor como prognóstico ou indicador de infecção por HPV de baixo ou alto grau (67,68).

Nos tumores epiteliais ovarianos, estudos avaliando a expressão imuno-histoquímica de p53 demonstram maior expressão nas neoplasias serosas em relação aos outros tipos histológicos. Além disso, carcinomas exibem a maior prevalência de superexpressão em relação a tumores borderline e adenomas (69). Dentre os carcinomas serosos, segundo O'Neill *et al.* (70), 64% dos tumores de alto grau e 18% dos tumores de baixo grau exibem alto nível de expressão (definido como mais de 75% de núcleos positivos), enquanto baixos níveis de positividade são vistos em 28% e 64% dos tumores de alto e baixo grau, respectivamente. Giurgea *et al.* (71) demonstrou positividade (definida como 1% ou mais de núcleos positivos) apenas em neoplasias serosas, sendo de 56,25% nos carcinomas de alto grau e 12,5% nos de baixo grau. 6,66% dos tumores borderline foram positivos e todos os adenomas foram negativos. Clinicamente, a expressão aumentada está associada a estágios iniciais avançados. Mutações no TP53 são encontradas em 80% dos carcinomas serosos de alto grau mas são incomuns nos de baixo grau, nos tumores borderline e adenomas (69,72). O valor prognóstico das alterações de p53 é controverso, com estudos relatando associação com maus prognósticos, enquanto outros não encontram relação com a sobrevida (56). Expressão imuno-histoquímica aumentada e mutações também são encontradas em carcinomas intraepiteliais da tuba uterina, e de acordo

com a teoria da origem tubária dos carcinomas, poderiam ser um evento precoce na carcinogênese dos carcinomas serosos de alto grau (11,73,74).

## **12.2. p16**

O p16 é um dos produtos do gene CDKN2A. Como supressor tumoral, sua transcrição é estimulada pelo dano ao DNA. Como já mencionado, pRb bloqueia a transcrição do p16, observando-se aumento dos níveis quando há perda de função de pRb. Esse efeito é observado em lesões escamosas e glandulares do colo uterino. A infecção pelo HPV produz o oncogene viral E7, que inativa pRb, levando a altos níveis de p16. Nessas lesões, aumento da expressão imuno-histoquímica de p16 está relacionado com aumento da expressão de mRNA's de E7. Observa-se aumento progressivo de expressão entre o epitélio cervical não-infectado, lesões de baixo grau, lesões de alto grau e carcinomas (67,68,75). A inativação do gene CDKN2A é um evento comum na carcinogênese humana (cerca de 50% das neoplasias malignas), através de deleções, metilações e mutações. O aumento da expressão de p16 é associada com maus prognósticos em neoplasias mamárias, cervicais, prostáticas e orais, enquanto a perda de expressão é relacionada com mau prognóstico em carcinomas tímicos (63,64,76,77).

Nas neoplasias epiteliais ovarianas, a expressão imuno-histoquímica elevada é encontrada principalmente nos tumores serosos, enquanto os mucinosos e endometrioides são negativos ou tem positividade baixa (72,78,79). O percentual de tumores positivos varia de acordo com o estudo, devido às diferentes definições de positividade e diferentes clones de p16 utilizados. A expressão relatada nos carcinomas varia entre 31% e 88% de núcleos positivos. Nos tumores borderline, entre 27% e 65% e nos adenomas, entre 45% e 70% (56). Apesar dessa variabilidade, observa-se maior expressão nos carcinomas, seguidos pelos tumores borderline e adenomas (80). Segundo alguns estudos, carcinomas serosos de alto grau possuem altos níveis de expressão, enquanto carcinomas serosos de baixo grau e tumores serosos borderline possuem níveis mais baixos, sem diferença entre os dois, o que é condizente com o modelo dualístico da carcinogênese ovariana (10,70,79). Entretanto, outros autores não demonstraram essa associação (81,82) A expressão imuno-histoquímica elevada, baixa ou negativa está relacionada a estágios iniciais avançados e piores prognósticos, enquanto valores intermediários se associam com

melhores desfechos (80,81,83). Em linhagens de células de carcinoma ovariano com TP53 mutante, é observado aumento na expressão de p16, o que seria uma tentativa de manutenção da via da apoptose. A combinação de p16 e p53 mutantes é relatada em tumores mais agressivos (55). Uma possível explicação para a associação entre altos níveis e maus prognósticos seria a presença de alterações no gene CDKN2A, levando a transcrição de formas de p16 sem atividade supressora (80). Por sua vez, carcinomas negativos seriam um grupo específico com perda total desse mecanismo de controle do ciclo celular (81).

### **12.3. p14**

p14, assim como p16, é uma proteína supressora tumoral transcrita a partir do gene CDKN2A. Da mesma maneira que p16, alterações no gene afetam a atividade de p14, e são encontradas em diversas neoplasias malignas (61,84,85). Em carcinomas mamários, Pare *et al.* (77) relata associação entre superexpressão de p14, histologia pouco diferenciada e maior chance de recorrência, argumentando que esse aumento de expressão reflete o aumento da resposta supressora tumoral à proliferação celular exagerada. Watanabe *et al.* (86) demonstrou maior expressão imuno-histoquímica de p14 em carcinomas endometriais do que em tecidos não-neoplásicos. Entretanto, carcinomas de alto grau exibiram maior negatividade do que os de baixo grau, o que demonstraria a perda desse mecanismo de controle do ciclo celular mais tardiamente na via carcinogênica. A perda de expressão de p14 é um evento comum em carcinomas cutâneos e meningiomas anaplásicos (85,87).

São escassos os estudos sobre o papel do p14 em tumores ovarianos, e esses avaliam somente carcinomas. Não foram encontrados relatos sobre tumores benignos e borderline. Dentre os estudos encontrados, utilizando Western Blot, Havrilesky *et al.* (88) mostrou que todos os carcinomas ovarianos foram negativos para p14. Vaskivuo *et al.* (60), trabalhando com a linhagem de adenocarcinoma ovariano OVCAR-3, demonstrou somente positividade basal em células com TP53 mutante. Utilizando imuno-histoquímica, Khouja *et al.* (89) demonstrou ausência de expressão em 89% dos carcinomas, expressão de até 50% de núcleos positivos em 11% dos casos e nenhum caso com expressão maior que 50%. Hashiguchi *et al.* (90) encontrou positividade (mais de 5%) em 89,1% dos carcinomas, mas não demonstrou associação com outras variáveis. O estudo de Saegusa *et al.* (91) mostrou

positividade fraca (menos de 50%) em todos os carcinomas, mas não encontrou diferença de expressão entre tipos histológicos, relação com prognóstico ou associação com a expressão de p16.

## **JUSTIFICATIVA**

Apesar de sua baixa incidência, o carcinoma ovariano exibe alta taxa de mortalidade, cuja diminuição não foi associada a melhoras no tratamento. Diversos estudos já demonstraram a importância das alterações das proteínas supressoras tumorais na sua patogênese e prognóstico, além de sua diferença de expressão entre benignos, borderline e malignos. Entretanto, a literatura não exibe consenso em relação a essas associações e possui grande variabilidade nos métodos utilizados. Nosso estudo é justificado pela necessidade de estabelecer ferramentas auxiliares na determinação do prognóstico de cada paciente. A imuno-histoquímica é um método utilizado diariamente na rotina dos laboratórios de patologia, sendo uma técnica familiar para a maioria dos profissionais. Isso permitiria uma aplicação imediata dos achados do estudo. Dada a variabilidade de resultados relatados, é necessária a confirmação dos dados da literatura mundial, contribuindo para o entendimento das alterações do ciclo celular e da origem desses tumores.

## **HIPÓTESES**

A expressão imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 mostra diferença entre tumores epiteliais ovarianos benignos, borderline e malignos.

A expressão imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 mostra diferença entre tumores epiteliais ovarianos serosos, mucinosos e endometrioides.

A expressão imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 mostra diferença entre carcinomas serosos de baixo grau, alto grau, mucinosos e endometrioides.

## **OBJETIVOS**

### **Principais**

Determinar a taxa de positividade imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 em tumores epiteliais ovarianos.

Estabelecer se há diferença de expressão imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 entre tumores benignos, malignos e borderline.

Estabelecer se há diferença de expressão imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 entre tumores serosos, mucinosos e borderline.

Estabelecer se há diferença de expressão imuno-histoquímica de p16, p14 e p53 entre carcinomas serosos de alto grau, serosos de baixo grau, mucinosos e endometrioides.

### **Secundários**

Determinar a proporção de cada tumor na população estudada.

Determinar a idade média do diagnóstico em cada tipo de tumor.



## REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2014 [cited 2016 Feb 13]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
2. INCA. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa [Internet]. 2016. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>
3. INCA. Atlas On-Line de Mortalidade. 2016; Available from: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>
4. Trétarre B, Molinie F, Woronoff A-S, Bossard N, Bessaoud F, Marrer E, et al. Ovarian cancer in France: Trends in incidence, mortality and survival, 1980-2012. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;139(2):324–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009082581530130X>
5. Kurman RJ. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract* [Internet]. 6h ed. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, editors. Boston, MA: Springer US; 2011. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0489-8>
6. Lowe K a, Chia VM, Taylor A, O'Malley C, Kelsh M, Mohamed M, et al. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Jul [cited 2016 Feb 13];130(1):107–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558050>
7. Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Am J Prev Med* [Internet]. Elsevier; 2015;1–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749379715006248>
8. Sopik V, Iqbal J, Rosen B, Narod SA, Hunn J, Rodriguez GC, et al. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part II. Case-fatality. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;138(3):1399–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491203>
9. Engholm G, Ferlay J, Christensen N, Kejs AMT, Johannesen TB, Khan S,

Leinonen MK, Milner MC, Ólafsdóttir E, Petersen T, Trykker H SH. NORDCAN: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in the Nordic Countries, Version 7.2 (16.12.2015). Association of the Nordic Cancer Registries. Danish Cancer Society [Internet]. [cited 2016 Feb 15]. Available from: <http://www.ancr.nu>

10. Lee YH, Heo J, Kim TH, Kang H, Kim G, Kim J, et al. Significance of cell cycle regulatory proteins as malignant and prognostic biomarkers in ovarian epithelial tumors. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 May 29 [cited 2016 Feb 4];30(3):205–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464733>
11. Kurman RJ, Shih I-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2010 Mar;34(3):433–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2841791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Silva EG. The Origin of Epithelial Neoplasms of the Ovary. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2016 Jan;23(1):50–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00125480-201601000-00006>
13. Gates C, Rice VM. Epithelial ovarian cancer: An overview. *World J Transl Med*. 2014;3(1):10–29.
14. Schorge JO, Modesitt SC, Coleman RL, Cohn DE, Kauff ND, Duska LR, et al. SGO white paper on ovarian Cancer: Etiology, screening and surveillance [Internet]. *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc.; 2010. p. 7–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.06.003>
15. Sopik V, Iqbal J, Rosen B, Narod SA. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence [Internet]. *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc.; 2015. p. 741–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.017>
16. American Cancer Society. Ovarian Cancer. 2016; Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003130-pdf.pdf>

17. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 2012;55(1):3–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343225>
18. Liu Z, Zhang T-T, Zhao J-J, Qi S-F, Du P, Liu D-W, et al. The association between overweight, obesity and ovarian cancer: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol* [Internet]. 2015;45(October):1107–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491203>
19. Madsen C, Baandrup L, Dehlendorff C, Kjær SK. Tubal ligation and salpingectomy and the risk of epithelial ovarian cancer and borderline ovarian tumors: A nationwide case-control study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015;94(1):86–94.
20. Sopik V, Rosen B, Giannakeas V, Narod SA. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part III. Prospects for the future. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;138(3):757–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.019>
21. Freitas F. Rotinas em ginecologia. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
22. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* [Internet]. 2011;305(22):2295. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2011.766>
23. Hogg R, Friedlander M. Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004;22(7):1315–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2004.07.179> <http://jco.ascopubs.org/content/22/7/1315.full.pdf>
24. Kurman R. WHO classification of tumours of female reproductive organs [Internet]. Lyon: IARC; 2014. Available from: <http://www.worldcat.org/oclc/871318767>
25. American Cancer Society. Survival Rates for Ovarian Cancer by Stage

- [Internet]. 2014 [cited 2016 Feb 21]. Available from:  
<http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/detailedguide/ovarian-cancer-survival-rates>
26. Erickson BK, Conner MG, Landen CN. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(5):409–14.
  27. Nik NN, Vang R, Shih I-M, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2014;9:27–45. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937438>
  28. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type i and type II. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014.
  29. Gharwan H, Bunch KP, Annunziata CM. The role of reproductive hormones in epithelial ovarian carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(6):R339–93.
  30. Auersperg N. Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: Unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;130(1):246–51. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.03.021>
  31. Kessler M, Fotopoulou C, Meyer T. The molecular fingerprint of high grade serous ovarian cancer reflects its fallopian tube origin. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):6571–96.
  32. Auersperg N. Letter to the editor - Article by Natalie Banet and Robert J. Kurman. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2015;34(3):303–4. Available from:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0004347-201505000-00015>
  33. Dubeau L, Drapkin R. Coming into focus: The nonovarian origins of ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.B).
  34. Staff S, Tolonen T, Laasanen S-L, Mecklin J-P, Isola J, Maenpaa J. Quantitative Analysis of gamma-H2AX and p53 Nuclear Expression Levels in Ovarian and Fallopian Tube Epithelium from Risk-reducing Salpingo-

- Oophorectomies in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Int J Gynecol Pathol*. 2014;33(3):309–16.
35. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:161–9.
  36. Lee Y, Miron A, Drapkin R. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol* [Internet]. 2007 [cited 2014 Feb 15];211:26–35. Available from:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2091/full>
  37. Crum CP, Nucci MR, Lee KR. *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology*. 2nd ed. Saunders; 2011.
  38. Auersperg N. The stem-cell profile of ovarian surface epithelium is reproduced in the oviductal fimbriae, with increased stem-cell marker density in distal parts of the fimbriae. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2014 Feb 4];32(5):444–53. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896717>
  39. Singer G, Kurman RJ, Chang H, Cho SKR, Shih I. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2002;160(4):1223–8. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1867233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  40. Kuhn E, Ayhan A, Shih IM, Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian Brenner tumour: A morphologic and immunohistochemical analysis suggesting an origin from fallopian tube epithelium. *Eur J Cancer* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;49(18):3839–49. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.08.011>
  41. Merritt MA, Bentink S, Schwede M, Iwanicki MP, Quackenbush J, Woo T, et al. Gene expression signature of normal cell-of-origin predicts ovarian tumor outcomes. *PLoS One*. 2013;8(11).
  42. Nakayama N, Nakayama K, Shamima Y, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, et al.

Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer*. 2010;116(11):2621–34.

43. Banet N, Kurman RJ. Two Types of Ovarian Cortical Inclusion Cysts. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2015;34(1):3–8. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0004347-201501000-00002>
44. Seidman JD. Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma Localizes to the Tubal-peritoneal Junction : A Pivotal Clue to the Site of Origin of Extrauterine High-grade Serous Carcinoma ( Ovarian Cancer ). *Int J Gynecol Pathol*. 2015;34:112–20.
45. Morency E, Leitao MM, Soslow RA. Low-Stage High-Grade Serous Ovarian Carcinomas: Support for an Extraovarian Origin. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2015;1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0004347-900000000-99433>
46. Yang-Hartwich Y, Gurrea-Soteras M, Sumi N, Joo WD, Holmberg JC, Craveiro V, et al. Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2014;4:6116. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4137344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Roh MH, Yassin Y, Miron A, Mehra KK, Mehrad M, Monte NM, et al. High-grade fimbrial-ovarian carcinomas are unified by altered p53, PTEN and PAX2 expression. *Mod Pathol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;23(10):1316–24. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=20562848&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.1038/modpathol.2010.119>
48. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's Genes XI* [Internet]. 2014. 940 p. Available from: <http://books.google.com/books?id=yXFfPkLq4yEC&pgis=1>
49. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*. 6th ed. 2013. 832 p.

50. Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics. 4th ed. Garland Science; 2010. 807 p.
51. Malumbres M. Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiol Rev* [Internet]. 2011;91(3):973–1007. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00025.2010>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742793>
52. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012;226(2):352–64.
53. Wang H, Zhang X, Teng L, Legerski RJ. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Exp Cell Res* [Internet]. Elsevier; 2015;334(2):350–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.011>
54. Alberts B. Molecular Biology of the Cell. 5th ed. Garland Science; 2007. 1392 p.
55. Saldanha SN, Tollefsbol TO. Pathway modulations and epigenetic alterations in ovarian tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 2014. 393-406 p.
56. Nam EJ, Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(6):1169–82.
57. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006;6(9):663–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1954>
58. Somasundaram K, MacLachlan TK, Burns TF, Sgagias M, Cowan KH, Weber BL, et al. BRCA1 signals ARF-dependent stabilization and coactivation of p53. *Oncogene* [Internet]. 1999;18(47):6605–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10597265>
59. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, et al. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*. 1998;395(September):124–5.
60. Vaskivuo L, Rys J, Koivupuu J, Myllynen P, Vaskivuo T, Chvalova K, et al. Azidothymidine and cisplatin increase p14ARF expression in OVCAR-3 ovarian cancer cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;216(1):89–97.

61. Yi Y, Shepard A, Kittrell F, Mulac-Jericevic B, Medina D, Said TK. p19ARF determines the balance between normal cell proliferation rate and apoptosis during mammary gland development. *Mol Biol Cell*. 2004;15(5):2302–11.
62. Mason SL, Loughran O, La Thangue NB. p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* [Internet]. 2002;21(27):4220–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082609>
63. Mitra AP, Hansel DE, Cote RJ. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Semin Oncol*. 2012;39(5):524–33.
64. Papoudou-Bai A, Barbouti A, Galani V, Stefanaki K, Rontogianni D, Kanavaros P. Expression of cell cycle and apoptosis regulators in thymus and thymic epithelial tumors. *Clin Exp Med*. 2015;
65. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;9(10):701–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2693>
66. Beckta JM, Ahmad SF, Yang H, Valerie K. Revisiting p53 for cancer-specific chemo- and radiotherapy: Ten years after. *Cell Cycle*. 2014;13(5):710–3.
67. Conesa-Zamora P. Role of cell cycle biomarkers in human papillomavirus related uterine lesions. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19(8):1412–24. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368798449>
68. Balan R, Caruntu ID, Amalinei C. The immunohistochemical assessment of HPV related adenocarcinoma: pathologic and clinical prognostic significance. *CurrPharmDes*. 2013;19(1873-4286 (Electronic)):1430–8.
69. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*. 2003;97(2):389–404.
70. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, McCluggage WG. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour.



Histopathology. 2007;50(6):773–9.

71. Giurgea LN, Ungureanu C, Mihailovici MS. The immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in ovarian epithelialborderline tumors. Correlation with clinicopathological factors. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(4):967–73.
72. Vang R, Shih I, Kurman R. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2009 [cited 2016 Feb 13];16(5):267–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2745605/>
73. Perets R, Wyant G, Muto K, Bijron J, Poole B, Chin K, et al. Transformation of the Fallopian Tube Secretory Epithelium Leads to High-Grade Serous Ovarian Cancer in Brca;Tp53;Pten Models. *Cancer Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;24(6):751–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.013>
74. Sehdev AS, Kurman RJ, Kuhn E, Shih I-M. Serous tubal intraepithelial carcinoma upregulates markers associated with high-grade serous carcinomas including Rsf-1 (HBXAP), cyclin E and fatty acid synthase. *Mod Pathol* [Internet]. 2010;23(6):844–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.60>
75. French D, Lorenzon L. HPV infections: Basis of neoplastic transformation and related molecular tests. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19(8):1371–8. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84876728634&partnerID=40&md5=c571e4913bb5b77c4beb56fa2b917aa0>
76. Li J, Poi M, Tsai M. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16INK4A and their relevance to cancer. *Biochemistry* [Internet]. 2011 [cited 2016 Feb 13];5566–82. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi200642e>
77. Pare R, Shin J-S, Lee SC. Increased expression of senescence markers p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK 4a</sup> in breast cancer is associated with increased risk of disease recurrence and poor survival outcome. *Histopathology* [Internet]. 2016;n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.12948>
78. Vang R, Gown AM, Farinola M, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, et al.

p16 expression in primary ovarian mucinous and endometrioid tumors and metastatic adenocarcinomas in the ovary: utility for identification of metastatic HPV-related endocervical adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(5):653–63.

79. Felix AS, Sherman ME, Hewitt SM, Gunja MZ, Yang HP, Cora RL, et al. Cell-Cycle Protein Expression in a Population-Based Study of Ovarian and Endometrial Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 2015;5(February):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00025/abstract>
80. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Gabrielli BG, Cummings MC, Wright RG, et al. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16INK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis. *Int J Cancer*. 1997;74:57–63.
81. Kommos S, du Bois A, Ridder R, Trunk MJ, Schmidt D, Pfisterer J, et al. Independent prognostic significance of cell cycle regulator proteins p16(INK4a) and pRb in advanced-stage ovarian carcinoma including optimally debulked patients: a translational research subprotocol of a randomised study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaek. *Br J Cancer* [Internet]. 2007 Jan 29 [cited 2016 Feb 16];96(2):306–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
82. Milde-Langosch K, Hagen M, Bamberger A-M, Löning T. Expression and prognostic value of the cell-cycle regulatory proteins, Rb, p16MTS1, p21WAF1, p27KIP1, cyclin E, and cyclin D2, in ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2003;22(2):168–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649672>
83. Sui L, Dong Y, Ohno M, Goto M, Inohara T, Sugimoto K, et al. Inverse expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol*. 2000;79:230–7.
84. Horn L-C, Richter CE, Eienkel J, Tannapfel A, Liebert U-G, Leo C. p16, p14, p53, cyclin D1, and steroid hormone receptor expression and human papillomavirus analysis in primary squamous cell carcinoma of the

- endometrium. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2006;10(4):193–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16844559>
85. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, et al. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol*. 2001;159(2):661–9.
  86. Watanabe J, Nishizaki R, Jobo T, Kamata Y, Hata H, Nishimura Y, et al. Expression of tumor suppressor gene product p14ARF in endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2004;23(3):234–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213599>
  87. Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DR, Proby CM. p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2004;122(5):1284–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22501.x>
  88. Havrilesky L, Darcy kathleen M, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2003;21:3814–25.
  89. Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R. The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2007;26:418–25.
  90. Hashiguchi Y, Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, Ishiko O, Ogita S. Combined Analysis of p53 and RB Pathways in Epithelial Ovarian Cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2001;32(9):988–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567230>
  91. Machida D, Ph BD, Okayasu I, Saegusa M, Machida D, Okayasu I. Possible Associations among Expression of p14 ARF , and the Balance of Apoptosis and Cell Proliferation in Ovarian Carcinomas. *Cancer*. 2001;92(5):1177–89.

92. Li Z, Ding S, Zhong Q, Li G, Zhang Y, Chen X, et al. Significance of MMP11 and P14 ARF expressions in clinical outcomes of patients with laryngeal cancer. 2015;8(9):15581–90.
93. Milea A, George SH, Matevski D, Jiang H, Madunic M, Berman HK, et al. Retinoblastoma pathway deregulatory mechanisms determine clinical outcome in high-grade serous ovarian carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;27(7):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336157>
94. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, et al. Hypermethylation-associated Inactivation of p14 ARF Is Independent of p16 INK4a Methylation and p53 Mutational Status 1. *In Vitro*. 2000;(23):129–33.
95. Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol*. 2008;26(32):5284–93.

**ARTIGO EM INGLÊS**

**p14 expression differences in ovarian benign, borderline and malignant  
epithelial tumors**

Vinicius Duarte Cabral, MD – [viniciusdcabral@gmail.com](mailto:viniciusdcabral@gmail.com)

Marcelle Reesink Cerski, MD, PhD – [mcerski@hcpa.edu.br](mailto:mcerski@hcpa.edu.br)

Ivana Trindade Sa Brito – [iv.trindad@hotmail.com](mailto:iv.trindad@hotmail.com)

Lucia Maria Kliemann, MD, PhD – [lkliemann@hcpa.edu.br](mailto:lkliemann@hcpa.edu.br)

Correspondence: Vinicius Duarte Cabral ([viniciusdcabral@gmail.com](mailto:viniciusdcabral@gmail.com))

Address: Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Serviço de Patologia

Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brasil, 90035-903

**Abstract:**

**Background:** Abnormalities in tumor suppressors p14, p16 and p53 are reported in several human cancers. In ovarian epithelial carcinogenesis, p16 and p53 show higher immunohistochemical staining frequencies in malignant tumors and are associated with poor prognosis. p14 was only analyzed in carcinomas, with conflicting results. There are no reports on its expression in benign and borderline tumors. This study aims to determine p14, p16 and p53 expression frequencies in ovarian benign, borderline and malignant tumors.

**Methods:** A cross-sectional study utilizing immunohistochemistry, performed on paraffin-embedded ovarian epithelial tumor samples. Fisher's exact test. Associations were considered significant when  $p < 0.05$ .

**Results:** p14 loss of expression was associated with malignant tumors (60% positive) ( $p < 0.05$ ), while 93% and 94% of benign and borderline tumors were positive. p16 was positive in 94.6% of carcinomas, 75% of borderline and 45.7% of benign tumors ( $p < 0.05$ ). p53 absent staining was associated with benign tumors (2.9% positive) ( $p < 0.05$ ) but no difference was observed between borderline (16.7%) and malignant tumors (29.7%). Carcinoma subtypes showed no difference in expression.

**Conclusions:** This is the first description of p14 expression in benign and borderline tumors. It remains stable in benign and borderline tumors, while carcinomas show a significant absence of staining. This may indicate p14 abnormalities occur later in carcinogenesis. p16 and p53 frequencies increase from benign to borderline and malignant tumors, similarly to previous reports, possibly reflecting the accumulation of inactive mutant protein. Future studies should investigate genetic abnormalities in p14 coding sequences and include all types of ovarian epithelial tumors.

**Keywords:** ovary; ovarian epithelial tumor; cancer; p14; ARF; p16, p53; immunohistochemistry

### **Background:**

Ovarian cancer is the seventh most incident cancer in women worldwide. In 2012, 238,719 new cases were diagnosed and 151,917 women died from the disease [1]. Malignant epithelial tumors comprise 90% of all ovarian cancers and are usually diagnosed at advanced stages, leading to high mortality and low survival rates [2,3]. Abnormalities in cell cycle control have been reported in a wide range of human cancers [4,5]. The eukaryotic cell cycle is divided in five phases: mitosis, gap 0 (G0) gap 1 (G1), synthesis (S) and gap 2 (G2). Most human adult cells are in G0 and there is no increase in cell size or DNA content. This state is maintained by tumor suppressor protein pRb. When external growth factors are present, the cell enters the G1 phase, during which there is duplication of all cellular components, except DNA. This is possible due to the release of the suppressing effects of pRb through the action of complexes formed by cyclins and cyclin-dependent kinases. The inactivation of pRb allows progression through G1 and into the synthesis phase, when DNA is replicated. When DNA damage, insufficient cell size or oncogenic stimuli are present, other tumor suppressor proteins are activated and prevent passage from G1 to S. If abnormalities are present in these proteins, mutated cells can proliferate unrestrictedly and generate a neoplasm [6–8]. Tumor suppressors' genetic and immunohistochemical alterations are a common finding in human cancers, including ovarian epithelial tumors, especially carcinomas [9–16]. In this study, we focus on three of these proteins: p14, p16 and p53.

p14 (also known as ARF) is transcribed from the CDKN2A gene. It sequesters MDM2 in the nucleolus, preventing p53 degradation. Additionally, it inhibits transcription factor E2F activity. These actions lead to cell cycle arrest [17,18]. Previous studies about p14 immunohistochemical expression in ovarian epithelial tumors have focused only on carcinomas and display conflicting results. Saegusa *et al.* described positivity in all carcinomas [19]. Hashiguchi *et al.* reported positivity in 89.1% of all carcinomas, while Khouja *et al.* found that 89% of carcinomas were negative [20,21]. None of these studies demonstrated any association with clinical parameters or prognosis. We found no reports on p14 expression in benign and borderline tumors.

p16 is also a product of CDKN2A. It prevents cell cycle advance by inhibiting cyclin D-cdk4/6, thus maintaining pRb's negative control over the restriction point [10]. p16 is suppressed by pRb, and high expression of p16 is associated to loss of pRb function, one of the most common abnormalities in cancer [22]. Higher expression rates are found in carcinomas, followed by borderline and benign tumors, despite a wide staining percentage variation among studies [15,23]. Some authors report differences between high-grade serous carcinoma (HGSC) and low-grade serous carcinoma (LGSC), with the latter not differing from serous borderline tumors. However, other studies show no difference between HGSC and LGSC [16,24–27]. When evaluated as prognostic factors, both high and low levels of p16 staining have been linked to worse outcomes, while intermediate levels were associated with longer survival times. Other reports found no association with survival [23,25–27]. In relation to epithelial types, serous tumors show high expression, while mucinous and endometrioid demonstrate low levels or absent staining [25,28,29].

p53 can arrest cell cycle progression or activate the apoptosis pathway, if DNA damage is extensive. In unaltered cells, p53 is constantly degraded by MDM2, leading to a very



short half-life. When DNA damage is present, several factors (such as p14) cause MDM2 phosphorylation. p53 is stabilized and cellular levels rise, serving as a transcription factor for some genes and repressing others [6]. Mutations in TP53 are a common event in most human cancers, transcribing inactive proteins, resistant to degradation and detectable by immunohistochemistry [22]. Ovarian carcinomas exhibit the highest rates of expression in comparison to borderline and benign tumors. Among carcinoma subtypes, HGSC are more positive than LGSC, mucinous, endometrioid and clear cell [15,30,31]. O'Neill *et al.* reported a high level of expression in 64% of HGSC and 18% of LGSC [24]. Some reports indicated that high levels of expression relate to poor prognosis, but others found no association [15,30]. In this study, we aimed to assess p14, p16 and p53 expression in ovarian epithelial tumors and to determine associations with disease-free survival time and clinical variables.

### **Results:**

Mean age of diagnosis was 49.36 (45.68 – 53.03) for benign tumors, 44.25 (38.24 – 50.26) for borderline tumors and 58.35 (54.39 – 62.32) for malignant tumors (95% confidence interval). Malignant tumors were associated with older age ( $p < 0.05$ ). Benign and borderline tumors showed no statistical difference. The highest rates of p14 immunoreactivity were found in benign tumors, decreasing in borderline tumors and even further in carcinomas, as shown in table 1. When considered positive (score 1 or higher) or negative, 93% of benign, 94% of borderline and 60% of malignant tumors were positive (figure 1). Loss of expression was associated with carcinomas when compared to borderline and benign tumors ( $p < 0.05$ ), but no difference was observed between the last two. Serous and mucinous tumors demonstrated no difference in expression (85.1% and 89.7%, respectively). Endometrioid tumors were significantly associated with loss of expression (all tumors were negative) ( $p < 0.05$ ).

p16 expression was higher in malignant tumors, decreasing in borderline and benign tumors (table 2). No borderline or malignant tumor showed less than 11% positive nuclei. Positivity (score 3) was found in 94.6% of carcinomas, 75% of borderline and 45.7% of benign tumors (figure 1). The different rates among all three types were statistically significant ( $p < 0.05$ ). 71.3% of serous, 48.7% of mucinous and 100% of endometrioid tumors were positive, but only serous and mucinous tumors were statistically different ( $p < 0.05$ ).

p53 staining was higher in malignant tumors, decreasing in borderline and in benign tumors. No benign or borderline tumor exhibited more than 50% positive nuclei (table 3). 29.7% of malignant, 16.7% of borderline and 2.9% of benign tumors were positive (score 2 or 3) (figure 1). The rate difference was significant in benign tumors ( $p < 0.05$ ), but not between borderline and malignant tumors. 66.7% of endometrioid, 12.8% of mucinous and 11.9% of serous tumors were positive. Statistical significance was demonstrated between endometrioid and serous tumors ( $p < 0.05$ ). No antibody showed expression differences among carcinoma subtypes. No correlations were found when comparing expression rates between each other.

### **Discussion:**

The main limitation of the study was its small sample size. Our main finding was the determination of p14 levels in benign and borderline tumors and their difference in relation to carcinomas. To our knowledge, no other study has investigated p14 in these tumors. 93% and 94% of benign and borderline tumors, respectively, were positive. Carcinomas showed a significant loss of expression, as reported by Khouja *et al.* and Havrilesky *et al.* [21,22]. Khouja *et al.* also reported no expression in normal ovaries ( $n = 10$ ). The high expression levels in benign and borderline tumors may indicate wild-

type p14 is not detectable, and positive staining reflects mutant proteins, unresponsive to negative feedback mechanisms. Another possible explanation is that p14 activity is maintained throughout carcinogenesis, being overexpressed in response to oncogenic signals, but lost at later stages. This has been proposed in endometrial carcinogenesis, where adenocarcinomas show greater expression than normal endometrium and high-grade tumors are associated with absent staining [12]. Similar results were reported in laryngeal carcinomas [32].

p16 levels were similar to previous reports: carcinomas are the most positive, followed by borderline tumors and adenomas [23,24]. 94.6% of carcinomas were positive, similar to reports by Dong *et al.* and Kommos *et al.* [23,26]. There is no consensus on interpretation methods or cutoff values for positivity, leading to a wide range of expression rates. Different clones also influence this variation [21,25]. The progressive increase in expression was also reported in normal mammary tissue and breast carcinomas [13]. Possible explanations include: progressive loss of pRb function and its repressive effect over p16; bypassing of p16's tumor suppressing effect by alterations in other components of cell cycle control, leading to overexpression in an attempt to maintain the control over cellular proliferation; accumulation of inactive mutant proteins [10,14,22,33]. We could not find differences in expression among carcinoma subtypes. However, p16 levels were statistically different between carcinomas and borderline tumors. Given that most carcinomas were high grade, this finding may corroborate the assumption that HGSC pathogenesis is independent from benign and borderline tumors [33]. High p16 levels were associated with serous histology, as previously described by Dong *et al.* and O'Neill *et al.* [23,24]. There was no association between p16 and p14 levels. Despite being transcribed from the same locus, they differ in exon 1. Mutations and methylations were reported in their shared

and unique sequences, explaining why they display non-related expressions [11,20,34,35].

p53 expression increased from benign to borderline and malignant tumors, as previously reported [30]. Analogously to p14 and p16, reports on p53 expression have different designs, interpretation methods and definitions of positive or negative. Expression rates vary according to the clone utilized. 29.7% of carcinomas in our sample were positive, a similar result to another study using the same antibody (PAb240) [30]. The gradual increase in p53 expression is explained by different half-lives between the wild-type protein (constantly degraded, short half-life) and mutant p53 (resistant to degradation, long half-life). While the first is rarely detectable, the latter accumulates in the cell and is more likely to be detected immunohistochemically [9]. It has been proposed that wild-type p53 inhibits p16 expression. Despite not showing statistical association, both staining percentages increased in a similar manner, which is compatible with this theory [21,22]. The majority of authors report significant differences between HGSC and LGSC or serous borderline tumors [19,31]. We did not find a statistically significant difference between borderline and malignant tumors or among carcinoma types. Endometrioid tumors were statistically associated with negative p14 and positive p53. While  $p < 0.05$ , we do not believe this is a valid association, given that all our endometrioid sample was composed of carcinomas, which are associated with low p14 and high p53 staining.

### **Conclusions:**

We have demonstrated that p14 is positive in benign and borderline tumors, while absent staining is associated with carcinomas. As observed in other organs, this may indicate loss of p14 activity is a late event in tumorigenesis [32,36]. Expression in

normal ovaries has been reported as absent, but this was based on a small (n=10) sample [21]. Further studies are necessary to determine staining levels in non-neoplastic ovarian tissue. p14 is not as extensively studied in ovarian tumors as p16, and reports on mutations and methylations of CDKN2A rarely specify if these abnormalities affect their shared or individual exons [11,20,34,35]. Future studies should report not only the presence of these alterations, but also their location in CDKN2A. Additionally, they should include benign and borderline tumors.

## **Methods:**

### **Sample selection:**

This is a cross-sectional study using buffered, 10% formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from women who underwent surgery for primary ovarian epithelial tumors at Hospital de Clinicas de Porto Alegre between January 2007 and January 2014. The original hematoxylin and eosin stained slides were reviewed and one paraffin block was selected from each case. We excluded possibly metastatic tumors, samples with insufficient epithelium for immunohistochemical staining and those with undifferentiated histology. Brenner tumors were not included due to their rarity in our archives. The final sample contained 143 tumors: 47 serous cystadenomas, 23 mucinous cystadenomas, 24 serous borderline tumors, 12 mucinous borderline tumors, 4 low-grade serous carcinomas, 25 high-grade serous carcinomas, 5 mucinous carcinomas and 3 endometrioid carcinomas.

### **Immunohistochemistry:**

Whole tissue sections were cut 3µm thick and mounted on silanized slides. Slides were incubated at 80°C for 60 minutes, deparaffinized and rehydrated. Water-bath antigen

retrieval was performed at 95°C for 60 minutes, utilizing citrate buffer ph 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol solution for 30 minutes. Slides were incubated overnight at 4°C with the the following primary antibodies: anti-p14 (1:25, ab3642, abcam®), anti-p16 (1:400, ab54210, abcam®) and anti-p53 (1:100, ab26, abcam®). ADVANCE™ (Dako) was used for secondary antibody incubation, followed by hematoxylin counterstaining and mounting. Positive and negative controls for each antibody were also stained.

Immunohistochemical expression was assessed individually by two pathologists. A third pathologist reviewed conflicting results and a final score was reached. Due to excessive background staining and previous reports about the lack of specificity of cytoplasmic expression, only unequivocal nuclear positivity was considered valid [19]. Each tissue section was read in its entirety and a score was assigned according to the percentage of positive nuclei in neoplastic epithelial cells: 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (11-50%) or 3 (51-100%) (figure 2). Based on previous studies, for p14, scores 1 or greater were considered positive [21]. For p16, only score 3 and for p53, scores 2 and 3 were positive [16].

### **Statistical Analysis:**

IBM SPSS Statistics version 22.0 (IBM Corporation, 2013) was used for all statistical calculations. Expression of p14, p16 and p53 and their association with other parameters were evaluated by Fisher's exact test and the Bonferroni correction. 95% confidence interval for the mean age of patients at diagnosis was submitted to post-hoc analysis (ANOVA and Tukey's range test). Associations were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### **List of abbreviations:**

G0: gap 0; G1: gap 1; S: synthesis; G2: gap 2; HGSC: high-grade serous carcinoma; LGSC: low-grade serous carcinoma; PPN: percentage of positive nuclei

**Ethics approval and consent to participate:**

This study was approved by Hospital de Clinicas de Porto Alegre's ethics committee (reference number 624.308). The researchers signed Hospital de Clinicas de Porto Alegre's medical records utilization term sheet and biologic material utilization term sheet.

**Availability of data and materials:**

The dataset supporting the conclusion of this article is included within the article and its additional files.

**Competing interests:**

The authors declare that they have no competing interests.

**Funding:**

This study was funded by Hospital de Clinicas de Porto Alegre research fund (FIPE).

**Authors' contribution:**

VC and LK conceived, designed and coordinated the study, participated in data collection and sample selection, reviewed H&E slides, analyzed the immunohistochemical slides, performed the statistical analyses and drafted the manuscript. MC reviewed H&E slides and analyzed the immunohistochemical slides. ISB participated in data collection, sample selection and manuscript drafting. All authors read and approved the final manuscript.

**Authors' information:**

VC, MC, ISB and LK: Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brasil, 90035-903.

**References:**

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer. 2014 [cited 2016 Feb 13]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
2. Trétarre B, Molinie F, Woronoff A-S, Bossard N, Bessaoud F, Marrer E, et al. Ovarian cancer in France: Trends in incidence, mortality and survival, 1980-2012. *Gynecol. Oncol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;139:324–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009082581530130X>
3. Lowe K a, Chia VM, Taylor A, O'Malley C, Kelsh M, Mohamed M, et al. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol. Oncol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 [cited 2016 Feb 13];130:107–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558050>
4. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J. Pathol.* 2012;226:352–64.
5. Wang H, Zhang X, Teng L, Legerski RJ. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Exp. Cell Res.* [Internet]. Elsevier; 2015;334:350–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.011>
6. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Lewin's Genes XI [Internet]. 2014. Available



from: <http://books.google.com/books?id=yXFfPkLq4yEC&pgis=1>

7. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*. 6th ed. 2013.

8. Malumbres M. Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiol. Rev.* [Internet]. 2011;91:973–1007. Available from:

<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00025.2010> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742793>

9. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;9:701–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2693>

10. Li J, Poi M, Tsai M. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16INK4A and their relevance to cancer. *Biochemistry* [Internet]. 2011 [cited 2016 Feb 13];55:66–82. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi200642e>

11. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, et al. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am. J. Pathol.* 2001;159:661–9.

12. Watanabe J, Nishizaki R, Jobo T, Kamata Y, Hata H, Nishimura Y, et al. Expression of tumor suppressor gene product p14ARF in endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *Int. J. Gynecol. Pathol.* [Internet]. 2004;23:234–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213599>

13. Pare R, Shin J-S, Lee SC. Increased expression of senescence markers p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4a</sup> in breast cancer is associated with increased risk of disease recurrence and poor survival outcome. *Histopathology* [Internet]. 2016;n/a – n/a.

Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.12948>

14. Saldanha SN, Tollefsbol TO. Pathway modulations and epigenetic alterations in ovarian tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* 2014.
15. Nam EJ, Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2008;18:1169–82.
16. Lee YH, Heo J, Kim TH, Kang H, Kim G, Kim J, et al. Significance of cell cycle regulatory proteins as malignant and prognostic biomarkers in ovarian epithelial tumors. *Int. J. Gynecol. Pathol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 [cited 2016 Feb 4];30:205–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464733>
17. Mason SL, Loughran O, La Thangue NB. p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* [Internet]. 2002;21:4220–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082609>
18. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. 2006;6:663–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1954>
19. Machida D, Ph BD, Okayasu I, Saegusa M, Machida D, Okayasu I. Possible Associations among Expression of p14 ARF , and the Balance of Apoptosis and Cell Proliferation in Ovarian Carcinomas. *Cancer.* 2001;92:1177–89.
20. Hashiguchi Y, Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, Ishiko O, Ogita S. Combined Analysis of p53 and RB Pathways in Epithelial Ovarian Cancer. *Hum. Pathol.* [Internet]. 2001;32:988–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567230>
21. Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R. The clinical importance of Ki-67,

p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2007;26:418–25.

22. Havrilesky L, Darcy kathleen M, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 2003;21:3814–25.

23. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Gabrielli BG, Cummings MC, Wright RG, et al. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16INK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis. *Int. J. Cancer.* 1997;74:57–63.

24. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, McCluggage WG. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology.* 2007;50:773–9.

25. Felix AS, Sherman ME, Hewitt SM, Gunja MZ, Yang HP, Cora RL, et al. Cell-Cycle Protein Expression in a Population-Based Study of Ovarian and Endometrial Cancers. *Front. Oncol.* [Internet]. 2015;5:1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00025/abstract>

26. Kommos S, du Bois A, Ridder R, Trunk MJ, Schmidt D, Pfisterer J, et al. Independent prognostic significance of cell cycle regulator proteins p16(INK4a) and pRb in advanced-stage ovarian carcinoma including optimally debulked patients: a translational research subprotocol of a randomised study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaek. Br. J. Cancer [Internet]. 2007 [cited 2016 Feb 16];96:306–13. Available

from:

[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360015&tool=pmcentrez  
&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)

27. Milde-Langosch K, Hagen M, Bamberger A-M, Löning T. Expression and prognostic value of the cell-cycle regulatory proteins, Rb, p16MTS1, p21WAF1, p27KIP1, cyclin E, and cyclin D2, in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol.* [Internet]. 2003;22:168–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649672>
28. Vang R, Shih I, Kurman R. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv. Anat. Pathol.* [Internet]. 2009 [cited 2016 Feb 13];16:267–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2745605/>
29. Vang R, Gown AM, Farinola M, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, et al. p16 expression in primary ovarian mucinous and endometrioid tumors and metastatic adenocarcinomas in the ovary: utility for identification of metastatic HPV-related endocervical adenocarcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2007;31:653–63.
30. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer.* 2003;97:389–404.
31. Giurgea LN, Ungureanu C, Mihailovici MS. The immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in ovarian epithelialborderline tumors. Correlation with clinicopathological factors. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2012;53:967–73.
32. Li Z, Ding S, Zhong Q, Li G, Zhang Y, Chen X, et al. Significance of MMP11 and P14 ARF expressions in clinical outcomes of patients with laryngeal cancer.

2015;8:15581–90.

33. Milea A, George SH, Matevski D, Jiang H, Madunic M, Berman HK, et al. Retinoblastoma pathway deregulatory mechanisms determine clinical outcome in high-grade serous ovarian carcinoma. *Mod. Pathol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;27:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336157>

34. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, et al. Hypermethylation-associated Inactivation of p14 ARF Is Independent of p16 INK4a Methylation and p53 Mutational Status 1. *In Vitro.* 2000;129–33.

35. Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DR, Proby CM. p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2004;122:1284–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22501.x>

36. Watanabe J, Nishizaki R, Jobo T, Kamata Y, Hata H, Nishimura Y, et al. Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Oncogene* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2004;23:15581–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22501.x>

### **Figures:**

Figure1.tif – Title: Figure 1 - Percentage of positive tumors. Legend: Percentage of p14, p16 and p53 positive tumors in benign, borderline and malignant tumors.

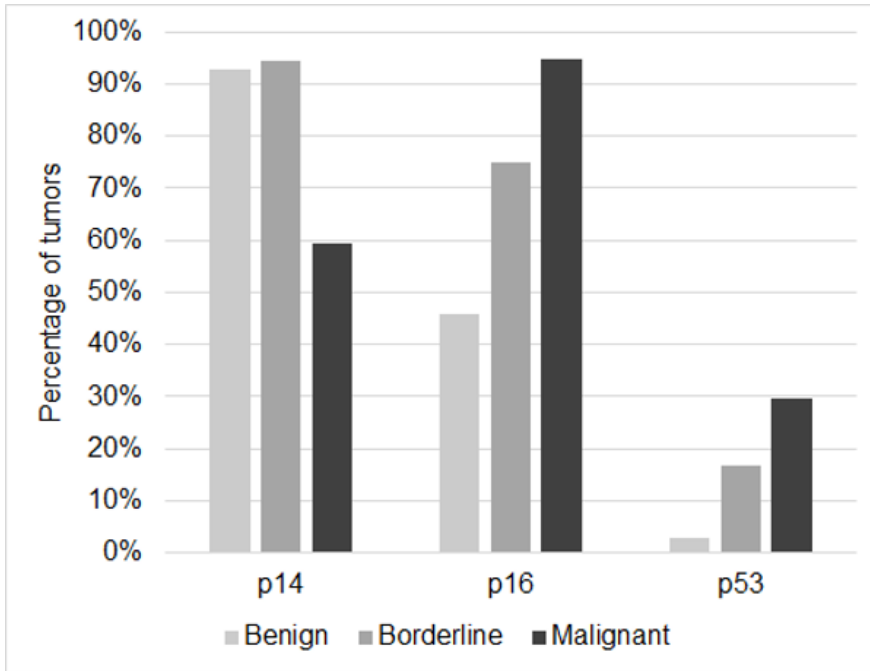
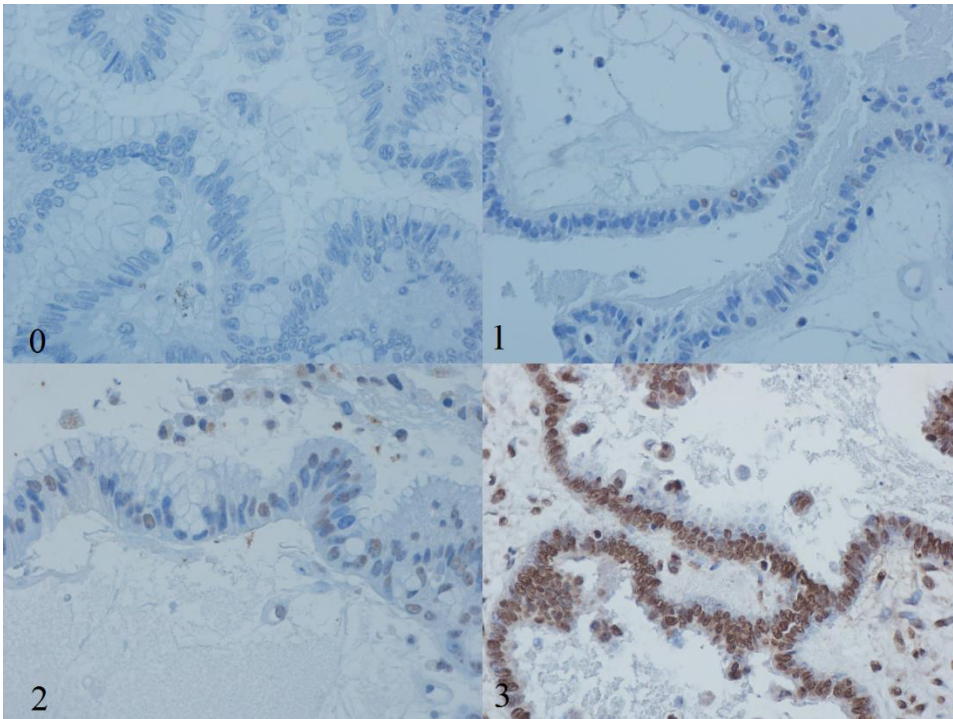


Figure2.tif – Title: Figure 2 - Expression scores. Legend: Immunohistochemical scores: 0 (0% positive nuclei), 1 (1-10% positive nuclei), 2 (11-50%) positive nuclei, 3 (51-100% positive nuclei).



**Tables and captions:**

Table 1 - p14 expression in benign, borderline and malignant tumors

PPN(*)	Benign	Borderline	Malignant
0	7.1%	5.6%	40.5%
1-10	5.7%	25%	18.9%
11-50	47.1%	66.7%	35.1%
51-100	40%	2.8%	5.4%

(\*) Percentage of positive nuclei

Table 2 – p16 expression in benign, borderline and malignant tumors

PPN (*)	Benign	Borderline	Malignant
0	1.4%	0%	0%
1-10	14.4%	0%	0%
11-50	38.6%	25%	5.4%
51-100	45.7%	75%	94.6%

(\*) Percentage of positive nuclei

Table 3 – p53 expression in benign, borderline and malignant tumors

PPN (*)	Benign	Borderline	Malignant
0	92.9%	63.9%	64.9%
1-10	4.3%	19.4%	5.4%
11-50	2.9%	16.7%	18.9%
51-100	0%	0%	10.8%

(\*) Percentage of positive nuclei



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O carcinoma ovariano, apesar dos avanços terapêuticos e diagnósticos recentes, continua apresentando uma alta taxa de mortalidade e morbidade. A literatura sobre alterações do ciclo celular nos tumores epiteliais ovarianos é abundante, mas exibe grande variabilidade de métodos e resultados. A discussão sobre a origem desses tumores ainda gera controvérsia entre os autores e não parece perto de uma conclusão. Nosso estudo utilizou imuno-histoquímica por sua conveniência e facilidade de execução em materiais emblocados em parafina. Nossos achados corroboraram a literatura já existente sobre o tema. A expressão de p14 em tumores benignos e borderline não havia sido previamente relatada. A diferença em relação aos carcinomas é um possível novo alvo de estudo sobre a carcinogênese ovariana.

## **PERSPECTIVAS**

Alterações no supressor tumoral p14 devem ser mais estudadas em tumores epiteliais ovarianos, visto que demonstramos uma diferença estatisticamente significativa. Os estudos sobre alterações no gene CDKN2A em tumores ovarianos apenas consideram a expressão de p16 e não precisam a localização da alteração na sequência do gene. Estudos futuros são necessários para estabelecer se as alterações afetam sequências compartilhadas ou exons particulares a p16 ou p14. As alterações no ciclo celular já foram exaustivamente estudadas, mas devem continuar a ser exploradas, dada a complexidade do assunto. O entendimento das alterações e sua temporalidade na patogênese ovariana pode levar a novas formas de rastreio precoce e novos alvos terapêuticos.

**ANEXO – Fotos das categorias de expressão imuno-histoquímica**

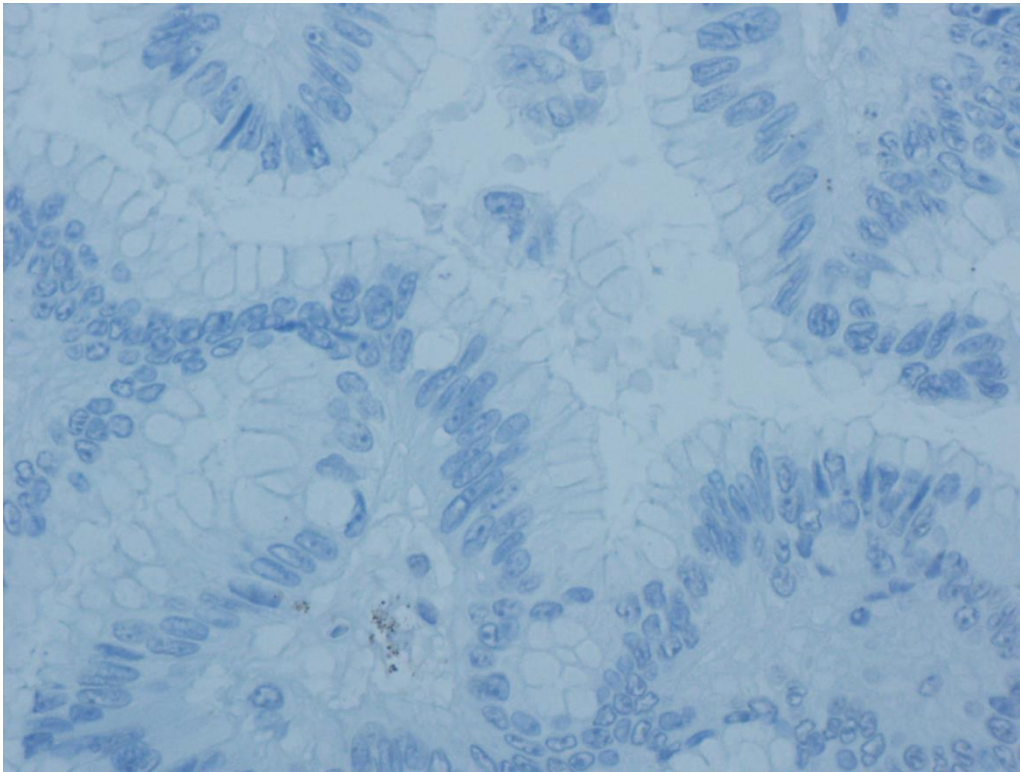


Figura 22 - Categoria 0 (0% de núcleos positivos)

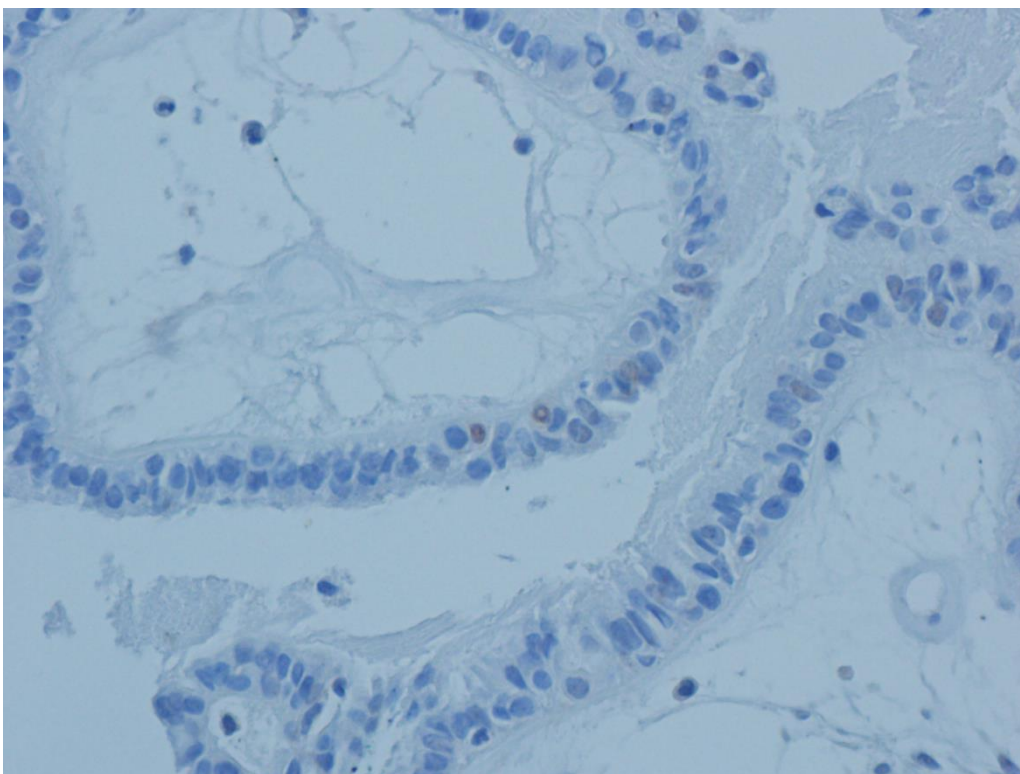


Figura 23 - Categoria 1(1-10% de núcleos positivos)

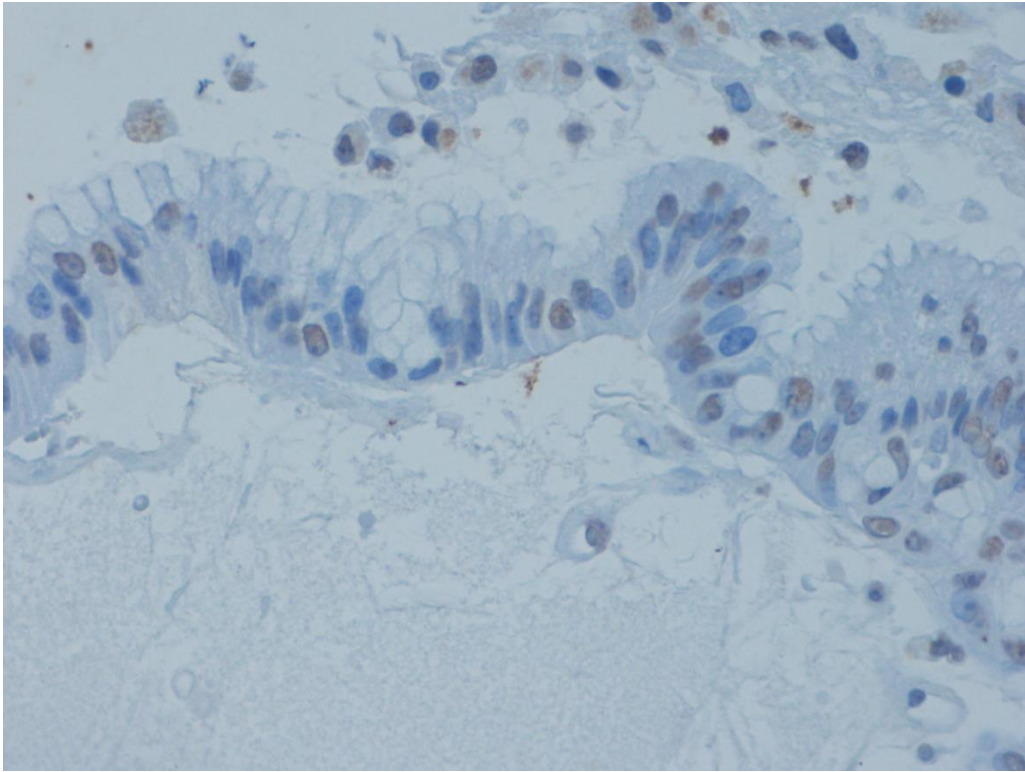


Figura 24 - Categoría 2 (11-50%) de núcleos positivos

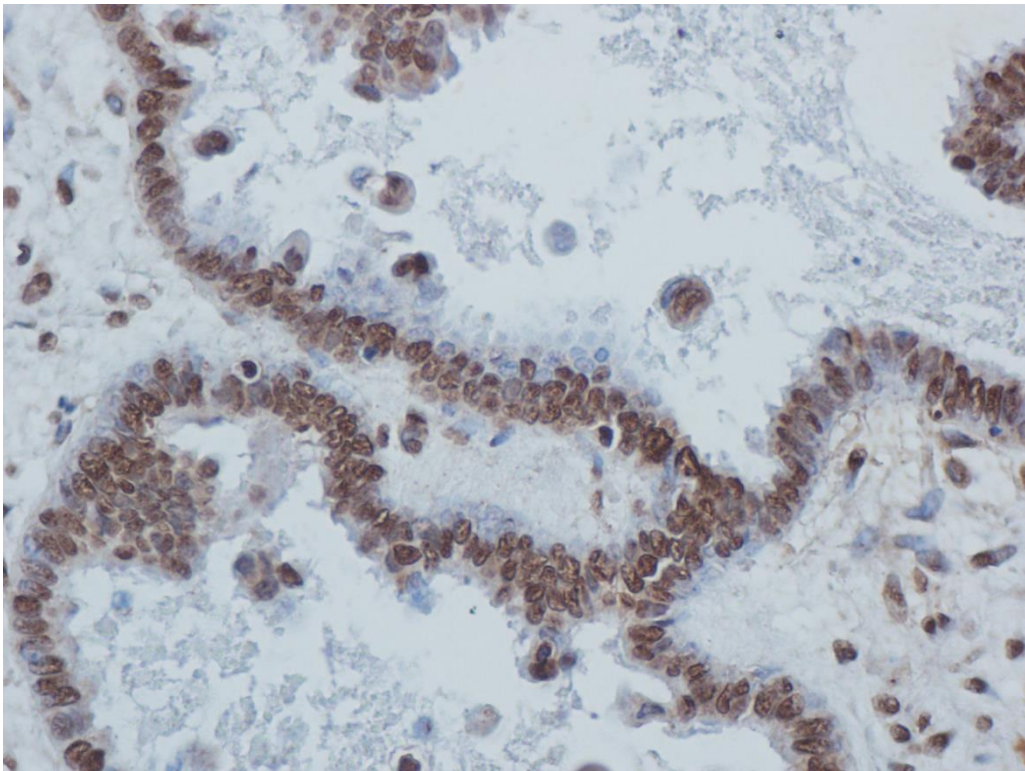


Figura 25 - Categoría 3 (51-100%) de núcleos positivos