

VALOR PROGNÓSTICO DAS PROTEÍNAS p53, C-ERB-2 E Ki67 NO CARCINOMA DO OVÁRIO

CRISTINA FRUTUOSO, MÁRIO RUI SILVA, NATÁLIA AMARAL, IRENE MARTINS,
CARLOS DE OLIVEIRA, HENRIQUE MIGUEL DE OLIVEIRA
Serviços de Ginecologia e Anatomia Patológica. Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra.

RESUMO

Apesar dos vários ensaios terapêuticos efectuados, a resposta completa ao tratamento do cancro do ovário é pouco frequente. Com o objectivo de estudar as frequências de expressão das proteínas p53, c-erbB-2 e Ki67, a sua importância na progressão tumoral e a sua relação com os factores de prognóstico clássicos, foi feito um estudo retrospectivo em 81 doentes com carcinoma do ovário, tratadas no Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Foi utilizado material fixado em parafina e o estudo foi feito usando técnicas de imunohistoquímica. Na nossa casuística, a idade média foi de $55,4 \pm 15$ (22-88); 66% das doentes tinham actividade física normal; 48,2% destas foram sujeitas a cirurgia completa com lesão residual $<2\text{cm}$ e 42% apresentavam tumor em estágio inicial e 58% no avançado. A idade, o *performance status*, o tamanho da lesão residual e o estágio tiveram associação significativa à sobrevida aos dois e cinco anos. A imunomarcagem foi positiva em 87% dos casos para a p53, em 51% para a c-erbB-2 e em 100% para a ki67. A p53 e a C-erbB-2 correlacionaram-se de forma significativa com o tamanho da lesão residual e o estágio. As doentes com marcação negativa para a c-erbB-2 tiveram sobrevida significativamente melhor. A análise multivariada mostrou que apenas o estágio é um factor de prognóstico independente. Verificou-se uma relação directa significativa entre p53 e ki67 e entre c-erbB-2 e p53. Concluímos que estes marcadores têm expressão forte no carcinoma do ovário e a p53 e c-erbB-2 correlacionaram-se com o estágio e com a lesão residual. Ainda que a imunomarcagem negativa para o C-erbB-2 fosse associada a melhor sobrevida, não se demonstrou que fosse um factor de prognóstico independente.

SUMMARY

The prognostic value of p53, C-erb B-2 and Ki67 in Ovarian Carcinoma

The prognosis in ovarian carcinoma remains poor. We need to identify patients who are less likely to respond to treatment. In order to evaluate the prognostic value of C-erbB-2, p53 and Ki 67 expression and correlate these markers with classic prognostic factors, we studied paraffin-embedded tumor tissue from 81 patients with epithelial ovarian cancer and made a quantitative evaluation of C-erbB-2, p53 and Ki 67 expression by immunohistochemistry. The results were: age 5.4 ± 15 (22-88); 66% with normal physical activity; 48.2% with residual disease $<2\text{cm}$; initial stage- 42% and advanced stage- 58%. Age, performance status, residual disease and stage were correlated with 2 and 5 years survival. Positive immunostaining: p53-87%, C-erb B-2-51% and Ki67-100%. P53 and C-erb B-2 were associated with residual disease and stage; patients with no C-erbB-2 staining had a significantly better survival. A direct and significant correlation was found between p53 and Ki67 and between C-erb B-2 and p53. We conclude that these markers have a high expression in ovarian carcinoma and p53 and C-er B-2 correlate with stage and residual disease. Although C-erb B-2 was associated with better survival, it was not found to be an independent prognostic factor.

INTRODUÇÃO

O cancro do ovário é, quase sempre, diagnosticado numa fase de doença avançada, quando a probabilidade de cura é baixa¹. O tratamento cirúrgico é, muitas vezes, insuficiente, sendo a maioria das doentes sujeitas a quimioterapia¹. Apesar dos vários esquemas terapêuticos ensaiados, a resposta completa continua a ser pouco frequente. Assim, seria importante identificar indicadores da agressividade individual do tumor e propor esquemas alternativos de tratamento.

Mais de 100 genes foram já implicados na história natural do cancro², podendo ocorrer quer activação de oncogenes quer inactivação de genes supressores tumorais³. Podem ser necessárias várias mutações para que o tumor se torne maligno e a ordem pela qual ocorrem pode não ser tão importante como a acumulação das mutações³. Sabemos também que a actividade proliferativa dos tumores é um indicador da agressividade tumoral, que parece relacionar-se com o curso da doença e com a resposta à quimioterapia¹.

O gene p53 é um gene supressor tumoral, localizado no cromossoma 17p, que controla a proliferação celular e codifica uma fosfoproteína nuclear, a p53⁴. A p53 mutada é metabolicamente mais estável do que a normal, o que permite a sua acumulação e a sua detecção imunohistoquímica⁵. A expressão da proteína p53 é quase exclusiva dos tumores malignos^{6,7}. O c-erbB-2 é um proto-oncogene, localizado em 17q, que codifica uma glicoproteína (p185Her) com actividade tirosina-quinase semelhante ao receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR)⁸. Alguns estudos sugerem que a expressão do c-erbB-2 possa estar associada a pior prognóstico no cancro do ovário⁹. O anticorpo Ki67 (acKi67) reage com o antígeno nuclear Ki 67, que está presente em todas as fases do ciclo celular, excepto na GO^{1,7}. A imunomarcagem pelo Ac Ki 67 permite, deste modo, a determinação da fracção de crescimento tumoral⁷ e a percentagem de células marcadas correlaciona-se com a fracção de crescimento tumoral, determinada pelo número de células em fase S¹⁰.

Neste trabalho, pretendemos estudar o valor do prognóstico no cancro do ovário da proteína p53, da proteína c-erbB-2 e da proteína Ki67 e a associação destes factores moleculares aos factores de prognóstico clássicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi feito um estudo retrospectivo de 81 casos de doentes com carcinoma do ovário, diagnosticados e tratados no Serviço de Ginecologia dos Hospitais da

Universidade de Coimbra (H.U.C.), de Outubro de 1989 a Dezembro de 1996. As variáveis avaliadas foram: a idade, o *performance status* (PS), o estágio da doença, segundo os critérios da FIGO¹¹, o subtipo histológico, o grau de diferenciação histológica, o tipo de cirurgia e o tamanho da lesão residual após tratamento cirúrgico. Os factores moleculares em estudo foram a proteína p53, a proteína associada ao gene c-erbB-2 e a proteína Ki 67. Foi utilizado material fixado em parafina, correspondente a tecido ovárico ou a biópsia de lesão secundária. A avaliação foi feita por imunomarcagem quantitativa, pelo método da avidina-biotina-peroxidase, sendo considerada a percentagem de células marcadas por cada 1000 células contadas. Utilizaram-se os seguintes anticorpos (ac): ac monoclonal A310-B anti-p53 (lab Biogenex), ac monoclonal A485 anti-erb B2 (lab DAKO) e ac policlonal A047 anti-ki67 (lab DAKO).

Na interpretação dos resultados para a p53 e a c-erbB2, consideraram-se três categorias: *negativa*, *positiva fraca* se a percentagem de células marcadas foi inferior a 25% e *positiva forte* se superior ou igual a 25%. A percentagem de células marcadas pelo Ac ki67 foi considerada fracção de crescimento tumoral. O estudo foi feito através da comparação das médias aritméticas das fracções de crescimento tumoral, determinadas para cada um dos sub-grupos em análise. Foram utilizados os testes t-student, para a diferença entre médias, e o teste de X-quadrado, para as variáveis categoriais; as curvas de sobrevivência foram definidas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank. Utilizou-se a regressão de Cox para verificar a independência das variáveis.

RESULTADOS

As características da amostra estudada são apresentadas no quadro I.

A idade média das doentes foi de 55,4 ± 15 anos (22-88A) e 66% tinham actividade diária normal à data do diagnóstico (PS - 0). De acordo com o protocolo de tratamento seguido no serviço, todas as doentes foram sujeitas a cirurgia para estadiamento da doença: em 60,4% foi efectuada cirurgia completa (histerectomia total + anexectomia bilateral + omentectomia infracólica + ressecção das massas tumorais visíveis), sendo as lesões residuais inferiores a 2 cm em 48,2% e superiores a 2 cm em 22,2%; em 17,3% dos casos só foi realizada redução tumoral e em 12,3% dos casos apenas se fizeram biópsias. As doentes com doença no estágio 1 fizeram quimioterapia adjuvante ou não, consoante o ramo de randomização (19 não fizeram quimioterapia). Nos

Quadro I

	n (%)	Sobrevida		
		2 anos*	5 anos*	
idade				
<50 A	28 (43,6)	11/22	7/16	NS
≤50 A	53 (56,4)	15/47	6/37	
				p=0,03
performance status				
0	54 (66)	26/42	12/42	p=0,001
1	16 (20)	1/16	0/15	
2	4 (5)	0/3	0/3	
3	6 (6,5)	0/5	0/5	
desconhecido	2 (2,5)			
				p=0,003
subtipo hist.				
seroso papilar	47 (58)	13/39	6/32	NS
mucinoso	15 (18,5)	5/12	4/11	
endometrióide	8 (10)	5/8	0/3	
indiferenciado	3 (3,7)	1/3	0/2	
células claras	2 (2,5)	0/2	0/2	
borderline	6 (7,3)	4/4	2/2	
				NS
Grau de diferenciação				
I	35 (48)	6/29	9/23	NS
II/III	38 (52)	13/34	3/27	
				p=0,02
Lesão residual pós-cirurgia				
<2cm	39 (48,2)	26/37	10/21	p=0,0002
>2cm	42 (51,8)	8/32	2/32	
				p=0,0004
Estádio				
inicial	34 (42)	21/28	10/18	p=0,0001
avanzado	47 (58)	12/43	2/40	
				p=0,0001
Quimioterapia				
sim	53 (65)			NS
não	28 (35)			
p53				
<25%	43 (53)	15/34	6/35	NS
≥25%	38 (47)	13/34	6/27	
				NS
c-erbB-2				
negativa	63 (65,5)	20/37	8/25	p=0,01
positiva	28 (34,5)	8/31	4/27	
				NS
Ki 67				
<20,3+	53 (66)	19/48	6/33	NS
>20,3	27 (34)	9/22	6/19	
				NS

+ n° médio de células marcadas; teste T-Student

* no estudo da sobrevida aos 2 e 5 anos, foram excluídas as doentes vivas com diagnóstico feito antes de 2 e 5 anos, respectivamente

restantes estádios, apenas oito doentes não foram sujeitas a quimioterapia adjuvante (uma por ter recusado tratamento, quatro por mau estado geral, três por idade > 80 anos). A quimioterapia usada foi sempre em esquema combinado, incluindo o Platínum ou derivado, em asso-

ciação com a Ciclofosfamida ou Taxol. O estudo da sobrevida mostrou que os grupos de doentes com P-0, estádio inicial da doença ou com lesão residual após a cirurgia inferior a 2 cm tiveram resultados significativamente melhores aos dois anos; o mesmo estudo feito aos cinco anos, revelou que também a idade e o grau de diferenciação histológica podem interferir, de forma significativa, nos resultados. Deve, também, ser salientado que, embora não fosse encontrada diferença nas sobrevidas para os subtipos histológicos considerados, o adenocarcinoma seroso-papilar, quando comparado com o subtipo mucinoso, foi, com maior frequência, um tumor pouco diferenciado e diagnosticado em estádios avançados, sendo esta diferença significativa (quadro II).

Quadro II

	Seroso papilar n=47	endometrióide n=8	mucinoso n=8
Estádio*			
- inicial	15	4	10
- avançado	32	4	5
GI+	19	4	11
GII/III	28	4	4

p=0,01 (*) e p=0,026 (+), aplicados ao subtipo seroso papilar e mucinoso

Os estudos de imunomarcção mostraram: para a p53: negativa - 17%; positiva fraca - 36% e positiva forte - 47%; para o C-erb B2: negativa - 51%; positiva fraca - 15% e positiva forte -35% e para o Ki 67: negativa - 0%; positiva fraca - 66% e positiva forte - 34%. Na interpretação dos resultados, consideraram-se, para a p53, as categorias >25% e <25% e para a c-erbB-2, as categorias marcação positiva e negativa (figuras 1, 2 e 3). O estudo da sobrevida aos dois e aos cinco anos, não mostrou diferenças para as classes de marcação da p53; o subgrupo com marcação negativa para o c-erbB2 teve melhor sobrevida aos dois anos (36 versus 54%; p=0.01) (quadro I).

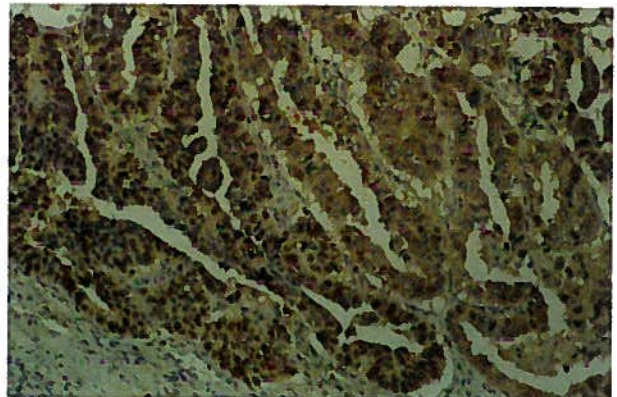


Fig. 1 - Carcinoma seroso-papilar, imunomarcção para p53, 200x.

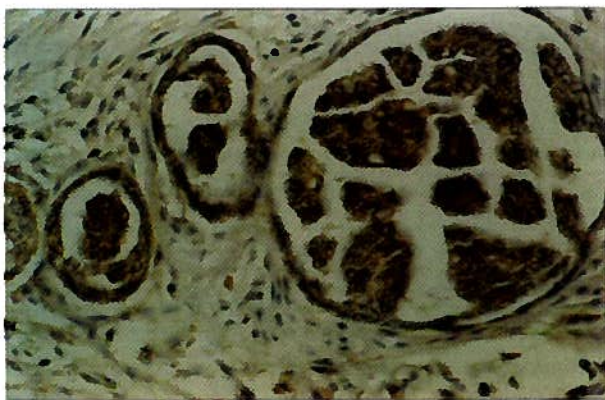


Fig. 2 - Carcinoma seroso-papilar, imunomarcção para c-erbB2, 200x.

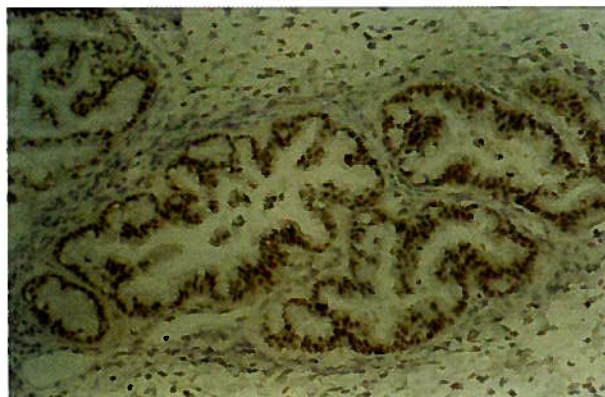


Fig. 3 - Carcinoma mucinoso, imunomarcção para Ki67, 200x

Feito o estudo comparativo entre os factores de prognóstico clássicos do ovário e as classes de imunomarcção, verificou-se existir associação significativa entre: marcação da p53 superior a 25% e tumor moderadamente ou pouco diferenciado, lesão residual > 2 cm e estágio avançado; marcação positiva para a c-erbB-2 e lesão residual > 2 cm e estágio avançado (*quadro III*). Em relação à proteína ki67, não se verificou qualquer diferença significativa entre as médias, quer por subtipo ou grau histológico, quer por estágio ou lesão residual após cirurgia. Foi feito o estudo estatístico, considerando diferentes associações de classes, sendo os resultados sobreponíveis.

As figuras quatro a seis mostram as curvas de sobrevida definidas pelo método de kaplan Meier. Os grupos de doentes com doença no estágio inicial, com lesão < 2 cm após cirurgia ou com tumores com marcação negativa para a c-erbB-2 têm sobrevida significativamente melhor. Não se verificou qualquer diferença por classe de marcação para a p53. A aplicação da regressão de Cox às variáveis estágio, lesão residual, p53 e c-erbB-2 mostrou que apenas o estágio é factor de prognóstico

Quadro III

	n (%)	KI 67+	p53*	c-erbB-2**
subtipo hist.				
seroso papilar	47 (58)	20,9	25	20
mucinoso	15 (18,5)	18,9	5	4
endometrióide	8 (10)	19,1	3	2
indiferenciado	3 (3,7)	35,6	1	1
células claras	2 (2,5)	5	2	1
borderline	6 (7,3)	17,3	2	0
		NS	NS	NS
Grau				
I	35 (48)	24,7	11	11
II/III	38 (52)	18,0	25	15
		NS	p=0.003	NS
Lesão residual após cirurgia				
<2cm	39 (48,2)	21,8	11	8
>2cm	42 (51,8)	18,8	27	20
		NS	p=0.0001	p=0,01
Estádio				
inicial	34 (42)	21,2	10	7
avançado	47 (58)	18,9	28	21
		NS	p=0.0007	p=0,02

+ n° médio de células marcadas; teste T-Student

* imunomarcção > 25% células

** imunomarcção positiva

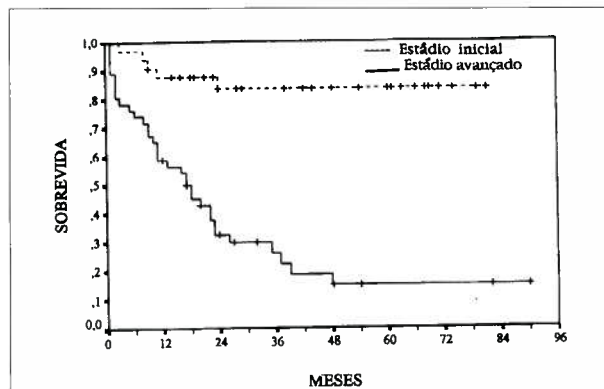


Figura 4 - Curva de sobrevida por estágio

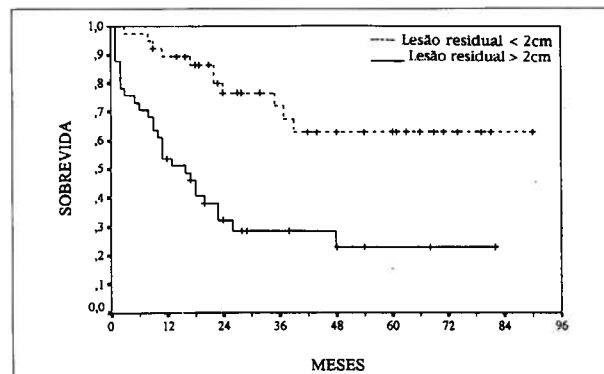


Figura 5 - Curva de sobrevida por tamanho de lesão residual independente.

A análise de regressão entre os três marcadores moleculares mostrou uma relação positiva e significativa

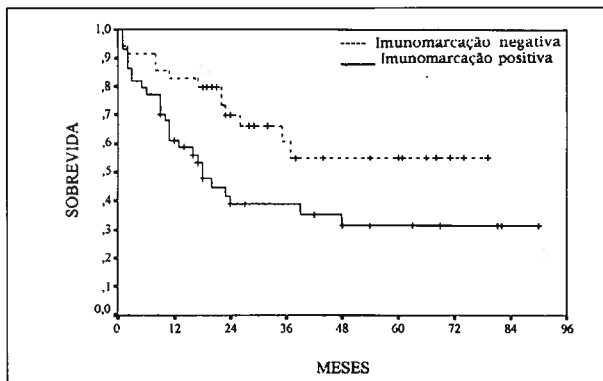


Figura 6 - Curva de sobrevivência por classe de imunomarcagem para a p53

entre a p53 e a ki67 e entre a p53 e a c-erbB2. Porém, qualquer das associações é fraca, já que apenas 10% do aumento de um marcador pode ser justificado pelo outro, existindo, provavelmente, outras causas para a variação de cada marcador.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a imunohistoquímica foi utilizada para estudar a frequência de expressão da p53, da c-erbB2 e da Ki 67 nos carcinomas do ovário e avaliar a relação destes marcadores com os factores de prognóstico clínico-patológicos, bem como o seu papel na progressão do tumor.

Os factores de prognóstico classicamente reconhecidos no cancro do ovário são a idade, o *performance status*, o estágio da lesão, a lesão residual após cirurgia e o grau de diferenciação histológico¹¹. Embora o subtipo histológico não seja, geralmente, aceite como factor de prognóstico, alguns autores referem piores resultados para o subtipo de células claras¹²; outros defendem que o sub tipo mucinoso tem melhor sobrevivência, provavelmente porque frequentemente se diagnostica nos estádios iniciais e apresenta boa diferenciação¹¹.

Nem todos estes factores são, no entanto, variáveis independentes: um tumor biologicamente mais agressivo tende a ser encontrado numa fase mais avançada, o que implica maior dificuldade na ressecção cirúrgica. Por outro lado, quanto maior for a disseminação peritoneal, maior será a probabilidade de se terem desenvolvido clones celulares resistentes à quimioterapia, sendo o prognóstico agravado, mesmo que tenha sido feita cirurgia de redução completa¹¹. A redução da massa tumoral associa-se, no entanto, a melhoria da perfusão e a um aumento da taxa de proliferação celular, facilitando a acção da quimioterapia¹¹. A quimioterapia feita com Platinium ou derivado é, por sua vez, dos factores que, isoladamente, mais influencia a sobrevivência¹³. Na verdade,

os marcadores de prognóstico que utilizamos, não derivam de um conhecimento suficientemente profundo da biologia tumoral, reflectindo, apenas, o comportamento do tumor verificado com os estudos já realizados.

Neste grupo, foi possível cirurgia completa em 60% das doentes, o que é sobreponível ao descrito por outros autores¹². Verificou-se, igualmente, o valor de prognóstico dos factores clássicos e nenhum dos subtipos histológicos se associou a melhor sobrevivência. Neste trabalho, o estudo imunohistoquímico foi feito em tecido ovárico ou em material de biópsia de lesão secundária (11%), fixado em parafina e recolhido antes de qualquer terapêutica com citostáticos. São vários os autores que referem que os estudos de múltiplos fragmentos de cancro do ovário, recolhidos em sítios anatómicos diferentes¹⁵ ou em líquido de ascite ou de conteúdo quístico⁷, mostram resultados concordantes, fazendo supor uma origem unifocal do cancro do ovário¹⁴. A imunohistoquímica é uma forma rápida e eficaz de identificar anomalias na proteína p53, já que detecta a maioria das proteínas mutantes que ocorrem nos tumores do ovário^{14,15}. Porém, as diferenças de material (parafina *versus* congelado) e a diferente especificidade dos anticorpos utilizados podem originar diferenças significativas na percentagem de células marcadas, nomeadamente pelos anticorpos anti- c-erbB-2¹⁶. Alguns autores, por outro lado, referem que a quimioterapia com cisplatino pode induzir aumento da p53¹⁷.

A literatura refere marcação positiva para a p53 em 30 a 88,8% dos cancros do ovário², o que mostra uma grande diversidade de resultados. Neste estudo, a imunomarcagem da p53 associou-se ao grau de diferenciação, ao estágio da doença e ao tamanho da lesão residual, não parecendo, no entanto, ter qualquer impacto sobre a sobrevivência global. São vários os trabalhos que mostram menor frequência de marcação nos estádios iniciais^{2,18,19}. Alguns autores^{2,6} referem que este dado pode indicar que a expressão da proteína p53 anormal é um acontecimento tardio na carcinogénese do ovário, que ocorre apenas na fase de metastização. Pelo contrário, outros autores referem que este é um acontecimento precoce, já que se manifesta logo nos estádios iniciais^{18,20}. Kuptvjanczyk¹⁸ identificou a proteína p53 mutada, quer em tumores *borderline*, quer em focos de endometriose adjacentes a carcinomas endometrioides pouco diferenciados, e sugere que esta mutação possa surgir precocemente e ser responsável pela progressão dos tumores *borderline* ou da cancerização de focos de endometriose. Vários autores referem a associação com o estágio^{2,7,16,19,19,21,22} e o grau de diferenciação^{2,7,16,19,21,22};

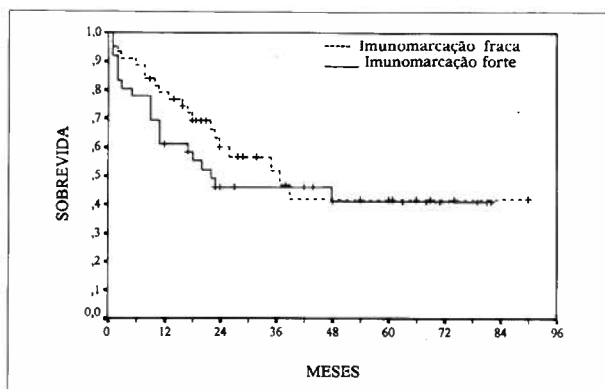


Figura 7 - Curva de sobrevida por classe de imunomarcacão para a c-erb B2

outros há que negam esta ligacão²², referindo que o gene p53 é um gene importante na gênese do cancro do ovário, não tendo, no entanto, relação com o seu comportamento biológico. Os dados relativos à repercussão na sobrevida são controversos. Kohler¹⁹ refere que a imunomarcacão positiva para p53 não se relaciona com a sobrevida, quer nos estádios iniciais, quer nos avançados, ainda que ocorra mais frequentemente nos sub-grupos de maior risco. Michael Levesque², pelo contrário, refere que a marcação positiva se associa à maior taxa de recorrências e morte nos sub-grupos de menor risco (tumores bem diferenciados, lesão residual inferior a 2 cm e estádios iniciais). Também Hartmann²² e Bosari²⁴ referem que a marcação positiva se associa à diminuicão da sobrevida, em análise univariada.

Neste trabalho, 50% dos tumores tiveram marcação positiva para o c-erbB-2; a marcação positiva associou-se ao tamanho da lesão residual > 2cm (36 versus 62%, $p=0,01$) e ao estádio avançado da doenca (35 versus 66%, $p=0,03$); a análise das curvas de sobrevida mostrou resultados significativamente melhores para o grupo com marcação negativa. A percentagem de doentes com marcação positiva para c-erbB-2 no cancro do ovário é variável e não é clara a relação com os factores de prognóstico. A literatura mostra taxas de imunomarcacão que oscilam entre 8,7% e 70,4%¹⁶. Há autores¹⁶ que mostram que a expressão do c-erbB-2 pode ser encontrada em diversos tecidos humanos, incluindo o ovário, e defendem, por isso, que só a imunomarcacão forte deve ser relevante no carcinoma do ovário. Estes mesmos autores, numa casuística de 105 doentes, não encontraram qualquer relação entre imunomarcacão forte e outros factores de prognóstico clínicos ou patológicos e não reconheceram valor de prognóstico ao c-erbB-2. Slamon⁹ reconheceu uma correlacão entre a sobrevida e imunomarcacão forte. Enriqueta Filip¹⁶ mostra que a imunomarcacão forte se relaciona de forma significativa

com o estádio e o tamanho da lesão residual, sendo um factor de risco independente.

Neste trabalho, a fracção de crescimento tumoral, determinada pela marcação da Ki 67, teve valores elevados (> 20%) em todos os sub-grupos estudados, não sendo possível estabelecer qualquer relação, quer com os factores de prognóstico clássicos, quer com a sobrevida. Apesar de a maioria dos investigadores defenderem que a actividade proliferativa do cancro do ovário tem significado prognóstico^{7,27}, há algum desacordo em relação a este dado^{27,28}. No entanto, são vários os autores que referem uma associacão significativa entre o estádio e a fracção de proliferacão determinada pelo Ki 67^{7,29}.

Neste estudo, o aumento da expressão da p53 foi acompanhada por um aumento da reactividade para a Ki67; o mesmo se pode observar em relação ao c-erbB-2. É interessante verificar que a perda da funçao de regulacão da proliferacão inerente à p53 mutante se acompanha de aumento da fracção de crescimento do tumor. Vários autores associaram já a p53 e Ki 67⁷, bem como correlacionaram o c-erbB-2 com o ki67²⁹. Estas observacões sugerem que o aumento da actividade proliferativa parece envolver alteracões na p53, que contribuiriam para a proliferacão do tumor⁹. No entanto, Goff³⁰, num estudo de 64 casos, não encontrou qualquer relação entre a marcação da c-erbB-2, da Ki67, da p53, do EGFR e do TNF α .

A importância do estudo dos marcadores biológicos é grande, sendo necessários mais estudos que nos permitam entender melhor a biologia tumoral e, provavelmente, definir esquemas de tratamento mais eficazes.

CONCLUSAO

A p53 marcou 83% dos carcinomas do ovário e associou-se ao grau de diferenciação, ao estádio da doenca e ao tamanho da lesão após cirurgia. O c-erbB-2 marcou 51% dos tumores estudados, associando-se ao estádio da doenca e ao tamanho da lesão após cirurgia. O grupo com marcação negativa para o c-erbB-2 teve sobrevida significativamente melhor. Foi encontrada uma relação directa e significativa entre a Ki 67 e a p53 e entre a p53 e a c-erbB-2.

Seria importante definir o papel destes marcadores na identificacão de sub-grupos de risco nos estádios iniciais e de sub grupos de resistencia à quimioterapia, nos estádios avançados.

BIBLIOGRAFIA

1. FELIX WONG WS, TATTERSALL MHN: Immunohistochemical determination of tumor growth fraction in human ovarian carcinoma. Br J Obst Gynaecol 1989;96:720-724

2. LEVES-UE AM, KATSAROS D, YU H AI et al: Mutant p53 Protein Overexpression is Associated with Poor outcome in Patients with Well and Moderate Differentiated Ovarian Carcinoma. *Cancer* 1995;75:1327-38
3. SHARP F, MASON WP, CREASMAN W: Ovarian cancer. Biology, diagnosis and management. 1st edition, 1992, Ed Chapman & Hall Medical, London, page 23
4. LANE DP, BENCHIMOL S: p53: Oncogene or Anti-oncogene? *Genes Dev* 1990;4:18
5. LEVINE AJ, MOMAND J, FINLEY CA: The p53 Tumor Suppressor Gene. *Nature* 1991;351:453-456
6. MARKS IR, DAVIDOFF AM, KERNS BJ et al: Overexpression and Mutation of p53 Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Research* 1991;51:2979-2984
7. HARLOZINSKA A, BAR JK, SEDLACZEK P, BERGER AI: Expression of p53 e ki67 Reactivity in Ovarian Neoplasms. *Am J Cím Patol* 1996;105:334-340
8. CIRISANO FD, KAREAN BY: The role of HER2/neu oncogene in gynecologic cancers. *J Society Gynecol Invest* 1996;3(3):99-105
9. SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES CA: Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712
10. SHARP F, MASON WP, CREASMAN W: Ovarian cancer. Biology, diagnosis and management. 1st edition, 1992, Ed Chapman & Hall Medical, London, page 208
11. BFREK IS, HACKER NF: Gynecologic neoplasms. Ovary and fallopian tubes. Cap 53. In: Haskell CM, eds. *Cancer Treatment*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, page 628-661
12. OMURA GA, BRADY MF, HOMESLEY CR: Long term follow up and prognostic factor analysis in advanced ovarian cancer: the Gynecologic Oncology Group Experience. *J Clin Oncol* 1991;9:1138-1150
13. SHARP F, MASON WP, CREASMAN W: Ovarian cancer. Biology, diagnosis and management. 1st edition, 1992, Ed Chapman & Hall Medical, London, page 347
14. MOK K, TSAO SW, NAPP RC: Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1996;52:5119-5122
15. LEE JH, KANG YS, PARK SP et al: p53 Mutation in Epithelial Ovarian Carcinoma and Borderline Ovarian Tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;85:43-50
16. FELIP E, DEL CAMPO MJ, RUBIO D et al: Overexpression of c-erb-2 in Epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1995; 75:2147-52
17. TISHLER RB, CALDERWOOD SK, COLEMAN CN: Increases in sequences specific DNA binding by p53 following treatment chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res* 1993;53:2212-2216
18. KUPRYJANCZYK J, BELL D, YANDELL D, SCULLY R, THOR A: p53 Expression in Ovarian Borderline Tumors and Stage 1 Carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1994;102:671-676
19. KHOLER MF, KERNS MB, HUMPHREY PA, MARKS JR, BAST RC, BERCHUCK A: Mutation and Overexpression of p53 in Early Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 643-50
20. KUPRYJANCZYK J, THOR A, BEANCHAMP R: p53 gene mutation and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4961-4965
21. KLEMI PJ, TAKAHASHI S, JOENSUU H, KIILHOLMA P, NARIMATSU E, MORI M: Immunohistochemical Detection of p53 in Borderline and Malignant Serous Ovarian Tumors. *Intern J Gynecol Pathol* 1994; 13:228-233
22. HARTMANN LC, PODRATZ KC, KEENEY GL et al: Prognostic Significance of p53 Immunostaining in Epithelial Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:64-69
23. NIWA K, ITOH M, MURASE T et al: Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1994;70:1191-1197
24. BOSARI S, VIALLE G, RODAELLI U, BOSSI P, BONOLDI E, COGGI G: p53 Accumulation in Ovarian Carcinomas and Its Prognostic Implications. *Hum Pathol* 1993;24:1175-1179
25. RUBIN SC, FINSTAD CL, WONG GY, ALMADRONES L, PLANTE M, LLOYD K: Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:162-9
26. VOLM M, BRUGGERMANN A, GUNTHER M: Diagnostic relevance of ploidy, proliferation and resistance predictive tests in ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1985;45:5180-5 27-BRESCIA R], BARAKAT RA, BELLER U: The prognostic significance of nuclear DNA in malignant epithelial tumour of the ovary. *Cancer* 1990;65:141-7
28. ERBA E, UBEZIO P, PEPE S: Flow cytometric analysis of DNA content in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 1989;60:45-50
29. KERNS BJ, JORDAN PA, FAERMAN LL: Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using quantitative analysis. *Am J Clin Pathol* 1994;101: 192-197
30. GOFF BA, SHY K, GREER BE, MUNTZ HG, SKELLY M, GOWN AM: Overexpression and relationships of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, p53, ki-67 and tumor necrosis factor alpha in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 1996;17(6):487-92