

## **6-DISCUSIÓN**

## **6-DISCUSIÓN**

### **6.1 RELACIÓN DE LA APOPTOSIS Y DE LA EXPRESIÓN DE P53, BCL-2 Y BAX CON EL GRADO DE MALIGNIDAD EN LOS TUMORES EPITELIALES DE OVARIO (BENIGNOS, BORDERLINE Y MALIGNOS)**

#### **6.1 a) Índice apoptótico**

En nuestra serie, la mayoría de los tumores benignos presentan un bajo índice apoptótico cuantificado en secciones de H-E y mediante la técnica de T.U.N.E.L.(71,4 % y 85,5 %, respectivamente), mientras que los carcinomas presentaban un índice apoptótico moderado o alto (37,8 % y 45,1 % en H-E y 35,4 % y 48,8 % mediante el T.U.N.E.L.). Los tumores borderline, por su parte, presentaban un índice apoptótico más heterogéneo, aunque en la mayoría era bajo, contabilizado tanto en Hematoxilina-eosina como mediante T.U.N.E.L. (48,1 % y 44,4 %, respectivamente) ( $p<001$ ).

Según el trabajo de Stauton<sup>398</sup>, los tumores benignos suelen presentar pocas figuras de apoptosis. Sin embargo, las lesiones premalignas, como los adenomas de colon o los nódulos hiperplásicos hepáticos, pueden mostrar índices elevados, incluso superiores a los encontrados en los adenocarcinomas de colon o en los hepatocarcinomas. Chan<sup>452</sup> en una serie de tumores ováricos, encontró un índice apoptótico bajo, tanto en el epitelio ovarico de superficie como en los tumores benignos, que era mayor en los tumores borderline y en los carcinomas, al igual que ocurre en nuestra serie. Halm y cols<sup>453</sup>, analizaron la apoptosis y la proliferación celular en la secuencia de cambios de metaplasia / displasia / carcinoma en 45 pacientes afectos de esófago de Barrett. En esta secuencia la apoptosis parece mantener la homeostasis tisular, encontrando un

mayor número de mitosis y de apoptosis como un mecanismo de recambio celular en el esófago de Barrett, situación que se pierde progresivamente en la secuencia metaplasia / displasia / carcinoma.

Aunque conceptualmente se considera que la disminución de la apoptosis se asociaría a la progresión tumoral por pérdida de la homeostasis tisular<sup>454</sup>, se ha demostrado que existe en muchos tumores malignos, in vivo, un alto índice apoptótico, tal como ocurre en la mayoría de los casos de nuestra serie.

Parece que los tumores malignos podrían tener dos patrones diferentes de crecimiento o recambio celular. El primero presenta un rápido recambio celular, caracterizado por un elevado índice apoptótico y mitótico, y el segundo, menos frecuente, un crecimiento rápido, con escaso recambio o pérdida celular. Este balance puede intervenir en el proceso de la tumorigénesis, y en los mecanismos reguladores de los mismos; resultando estos ser diferentes en los diferentes tumores.

### **6.1 b) La expresión de proteínas de p53**

La mayoría de los tumores benignos (71,4 %) presentaban una expresión de p53 baja o nula. En los tumores borderline el 96,2 %, mostraban una tinción nuclear inferior al 75 % de las células tumorales; sin embargo el 32,9 % de los carcinomas presentan una expresión nuclear alta o global con más del 75 % de las células tumorales con tinción nuclear ( $p < 0,001$ ).

Darai y cols.<sup>455</sup> en una serie de 79 casos de tumores ováricos, estudiaron la expresión de p53. Aunque no se relacionó la expresión de p53 con otros parámetros clínico-patológicos, se encontró un mayor porcentaje de células p53 positivas en los carcinomas que en los tumores borderline. Este hecho sugiere que la expresión de p53 puede ayudar a distinguir los tumores

borderline de los malignos. En nuestra serie, esta diferencia no se cumple, ya que muchos de los tumores borderline expresan proteína p53 en más del 50 % de las células, y existe una minoría de adenocarcinomas con un bajo porcentaje de células tumorales con tinción p53. Los criterios histológicos establecidos son suficientes para diferenciar y hacer un diagnóstico correcto entre los tumores borderline de los carcinomas. Chan<sup>452</sup> encontró una alta inmunotinción de p53 en más del 50 % de los carcinomas, mientras que los tumores borderline y benignos mostraban una proteína p53 moderada. Además, estudió el gen TP53 en estos tumores y mostró que la mutación del gen no es condición indispensable para la alta expresión de p53 en los tumores borderline y en algunos carcinomas. En este sentido, consideramos que la expresión de la proteína en los tumores borderline y en los carcinomas se correspondería en la mayoría de los casos a la proteína funcional estabilizada. Se sabe que la alteración del gen TP53 es un evento tardío en la carcinogénesis ovárica, y se suelen encontrar en carcinomas con estadios de la FIGO avanzados (III-IV). Dicha mutación es la que producen una proteína inactiva de mayor vida media que se manifiesta con una alta expresión inmunohistoquímica .

También se ha relacionado una sobreexpresión de p53 con mutaciones del gen TP53 en los carcinomas de colon avanzados, pero no en las lesiones premalignas como los adenomas<sup>456</sup>. Esta asociación entre tumores y lesiones preneoplásicas también se ha descrito en el carcinoma de endometrio y la hiperplasia endometrial<sup>457</sup>.

### **6.1 c) La expresión de proteínas de bcl-2 y bax**

En nuestra serie, aunque todos los grupos presentan una expresión de bcl-2 variable, se relaciona una alta expresión de bcl-2 en los tumores benignos. La expresión de bcl-2 en los

tumores malignos y en los borderline es muy heterogénea. Sin embargo, un 14,6 % de los carcinomas tienen una alta expresión de esta proteína ( $p=0,032$ ).

Respecto a la expresión de bax, no encontramos diferencias llamativas entre los grupos. Existe un mayor porcentaje de casos de tumores benignos con baja expresión de bax. Los tumores malignos y borderline tienen una expresión similar, aunque un 13,4 % de los carcinomas la tienen baja o nula ( $p=0,001$ ).

Se ha postulado que la proteína bcl-2 puede jugar un papel en la carcinogénesis, bloqueando la apoptosis en las lesiones preneoplásicas, manteniendo vivas las células con daño celular, y, por tanto, permitiendo el acúmulo de daño genético en las sucesivas mitosis. Sin embargo, el papel de la proteína bax se encuentra relacionado con la funcionalidad de la proteína p53, que es la que activa su transcripción para que comience la apoptosis celular.

Witty y cols<sup>458</sup>, hallaron que la proteína bcl-2 y sus homologos (Bcl-xL, Mcl-1 y Dad-1) se expresan tanto en los tumores benignos como malignos, aunque se ve en un mayor porcentaje en los primeros. Sin embargo, también encontraron una expresión de bax elevada en la mayoría de los carcinomas.

Chan y cols<sup>452</sup>, no estudiaron la proteína bax, pero sus resultados con la proteína bcl-2 concuerdan con lo descrito, y con nuestra serie, mostrando una elevada expresión de la proteína tanto en los tumores benignos como en los borderline y en un menor porcentaje de los carcinomas.

Wehrli y cols<sup>459</sup> en una serie de 28 casos de tumores ováricos valoraron las proteínas bcl-2, bax, bcl-x y mcl-1, encontrando una expresión de bcl-2 y bcl-x disminuida en los tumores malignos, mientras que no encontraron diferencias en la del bax, entre los tumores benignos, borderline o malignos.

Marone y cols<sup>460</sup> estudió mediante PCR-transcriptasa inversa y expresión proteica por western blot el bcl-2 y el bax en tumores benignos, borderline y malignos de ovario. Demostró una mayor expresión de bcl-2 en el tejido normal y en los tumores benignos, mientras que la presencia de bax fue mayor en el tejido neoplásico que en el normal, pero no discrimina los tumores borderline, ni el tipo histológico.

Nuestros resultados concuerdan con los hallados en otros estudios. Por una parte, se ha observado una intensa expresión de bcl-2 en el epitelio normal de la superficie ovárica o en el epitelio que tapiza los tumores quísticos benignos; en los tumores borderline se mantiene una alta o moderada en un porcentaje considerable, mientras que tiende a perderse en los tumores malignos. La expresión de bax parece más alta en los tumores malignos, en relación a una proteína p53 funcionante y a un programa de muerte celular programada. En nuestra serie un 14,6 % de los casos de los tumores malignos presentan una alta positividad de bcl-2 y el 13,4 % de los casos una baja o nula bax. Estos datos, hacen pensar que en los tumores malignos con este perfil inmunohistoquímico, podrían presentar quimioresistencia en relación a una baja susceptibilidad para entrar en un programa de apoptosis.

En resumen, la expresión de bcl-2 en las lesiones preneoplásicas o de bajo potencial de malignidad, como los tumores borderline, podría ser un evento en la secuencia de pasos moleculares que desembocarían hacia un carcinoma invasor. Por otro lado, la elevada tasa de bcl-2 en los tumores malignos ya establecidos, podría considerarse como factor de quimiorresistencia, aún más si se acompaña de una baja expresión de proteína bax.

## **6.2 RELACIÓN DE LA APOPTOSIS Y DE LA EXPRESIÓN DE P53, BCL-2 Y BAX CON LOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE LOS TUMORES OVÁRICOS**

En un reciente estudio, Ono y cols<sup>230</sup> han analizado, mediante la técnica de “microarrays”, 9121 genes en 5 carcinomas serosos y 4 carcinomas mucinosos, comparando el tejido tumoral con el ovárico normal correspondiente. Observaron en todos los casos, 55 genes sobreexpresados involucrados en la proliferación celular y en la prevención de la apoptosis, y otros 48 genes funcionalmente inhibidos, en comparación con el tejido benigno. Asimismo, objetivaron como 115 genes se expresaban de diferente manera entre los tumores serosos y en los mucinosos . Por otro lado, algunos de los mecanismos moleculares descritos en la carcinogénesis de los tumores de ovario son comunes, pero se han descrito cambios moleculares específicos para cada tipo histológico.

### **6.2 a) Índice de apoptosis**

En nuestra serie los tumores borderline y los carcinomas de estirpe mucinosa presentan un índice apoptótico bajo en un elevado porcentaje de casos. Los tumores borderline de tipo seroso presentan en una mayoría de casos un índice bajo-moderado. Respecto al resto de tipos de carcinomas , serosos, endometrioides y de células claras, presentan una distribución de casos por grupo muy similar con un alto índice apoptótico contabilizado en secciones de H-E y mediante técnica de T.U.N.E.L con una  $p < 0,001$  en ambas técnicas.

Nuestros resultados, confirman la diferente susceptibilidad que tienen, al menos los tumores serosos y los mucinosos, para la muerte celular programada, probablemente por la

diferencia observada por Ono y cols<sup>230</sup>, en 115 genes involucrados en la proliferación celular y en la prevención de la apoptosis.

Stauton y cols<sup>398</sup>, demostraron una amplia variabilidad en la cantidad de apoptosis entre las diferentes neoplasias humanas, lo que refleja que cada tipo de tumor tiene una susceptibilidad específica para entrar en un programa de muerte celular programada. Asimismo Soini y Pääkkö, en una serie con tumores germinales, demostraron que el carcinoma embrionario, cuyo curso es el más agresivo de todos, presentaba un mayor índice apoptótico<sup>461</sup>.

Diebold<sup>462</sup> mostró que los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis, se expresaban de manera heterogénea en los diferentes fenotipos histológicos en el cáncer de ovario.

### **6.2 b) Expresión de proteína p53**

En nuestra serie, los tumores borderline y los carcinomas de estirpe mucinosa presentan un alto porcentaje de casos con nula o baja expresión de p53. Sin embargo un 64,3 % de los tumores borderline de tipo seroso presentan una mayor expresión de p53. En los carcinomas con otros tipos histológicos, la mayor expresión de p53 lo presentaban los serosos, con un 62,1 % de casos en más del 75 % de las células tumorales. Por otro lado, los carcinomas endometrioides y los de células claras presentaban una expresión de p53 similar, presentando una positividad baja-moderada en la mayoría de ellos ( $p < 0,001$ ).

Bosari y cols<sup>463</sup> encontraron una expresión de p53 en el 50 % de los carcinomas serosos, 35 % de los mucinosos y en el 39 % de los endometrioides. Diebold y cols<sup>462</sup> encontraron baja o nula positividad en los tumores borderline y en los carcinomas de tipo mucinoso, lo que coincide



con nuestros resultados. También coinciden con la alta expresión de p53 que presentan la mayoría de los carcinomas serosos papilares.

### **6.2 c) La expresión de proteínas de bcl-2 y bax**

La expresión de bcl-2 en la mayoría de los casos de tumores borderline de tipo serosos era moderada-alta. Los tumores borderline y los carcinomas de estirpe mucinosa se presentan con una mayoría de casos que expresan bcl-2 en bajo-moderado porcentaje. El adenocarcinoma seroso papilar no presenta expresión de bcl-2 en un 34,5 % de los casos, y una expresión baja en un 41,4 %. Sin embargo los carcinomas endometrioides y de células claras presentaban una expresión de bcl-2 muy similar, aunque llama la atención que los carcinomas de células claras presentan 31,3 % de expresión en > 75 % de las células tumorales ( $p=0,034$ ).

La expresión de bax en la mayoría de los tumores borderline de tipo seroso, al igual que la de bcl-2, era moderada-alta. También en los carcinomas serosos papilares fue alta-moderada. La mayoría de los casos de tumores borderline de tipo mucinoso presentaron una expresión nula de bax, mientras que el 50 % de los carcinomas mucinosos fue moderada. En los carcinomas endometrioides y en los tumores de célula clara, no hubo grandes diferencias de porcentajes entre los grupos de expresión aunque un mayor número de casos fue nula-baja para la proteína bax ( $p<0,001$ ).

Diebold y cols<sup>462</sup> describen diferencias en la expresión de bcl-2 entre los tipos histológicos; se observa más frecuentemente en los carcinomas endometrioides y en tumores borderline de tipo seroso. En los carcinoma serosos papilares encuentran un elevado porcentaje tanto para bcl-2 como para p53. Sin embargo, para los tumores borderline y malignos de tipo mucinoso no se expresan ambos marcadores. Estos resultados son muy similares a los encontrados en nuestra serie,

exceptuando que en la de Diebold, en la que no está representado el tipo histológico de carcinoma de célula clara, y que en nuestra serie los carcinomas seroso papilar expresaban un alto porcentaje de p53, pero no de bcl-2 en la mayoría de los casos. .

Wehrli y cols <sup>459</sup> también encontraron diferencias en la expresión de bcl-2 y bax, entre los tumores borderline y carcinomas de estirpe mucinoso y los de estirpe seroso.

Una mención especial merecen los carcinomas de células claras, que parecen tener un curso clínico y un comportamiento biológico más agresivo que el resto de los tipos histológicos, presentando tiempos de supervivencia y periodos libres de enfermedad más cortos, asociado, entre otros factores a una resistencia a la quimioterapia convencional con los derivados del platino<sup>84</sup>. En nuestra serie, el 31,3 % de los casos de los carcinomas de célula clara presentan una expresión de bcl-2 en > 75 % de las células tumorales (p=0,034), siendo un 43,8 % de los casos baja para el bax (p<0,001), lo que podría estar en relación con mayor grado de quimiorresistencia y peor pronóstico ya establecido por otros autores.

### **6.3 CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES FACTORES BIOLÓGICOS Y LOS FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS YA ESTABLECIDOS EN LOS CARCINOMAS DE OVARIO**

#### **6.3 a) Índice apoptótico**

El índice apoptótico mostró una correlación positiva con otras variables como el grado de diferenciación, el estadio de la FIGO, grado de necrosis y el grado nuclear (p<0,05).

En la serie de Diebold <sup>462</sup> existía una relación entre la apoptosis y el alto grado de diferenciación. Sohn y cols<sup>464</sup> estudiaron una serie de 40 casos de carcinoma de próstata y

asociaron el índice apoptótico al grado histológico de Gleason. Schwandner y cols<sup>465</sup> en una serie de 160 tumores rectales no encontraron correlación entre el índice apoptótico con variables pronósticas clínicas ya establecidas como la edad, sexo, tamaño del tumor, ó nivel de CEA ( $p>0,05$ ). Sin embargo si hallaron una asociación con el grado de diferenciación, estadio TNM, y la expresión de p53 y bcl-2.

### **6.3 b) Expresión de proteína p53**

La expresión de p53 mostró una correlación positiva con otras variables como el grado de diferenciación, el estadio de la FIGO, grado de necrosis y el grado nuclear ( $p<0,05$ )

En la serie de Klime y cols<sup>466</sup> la positividad inmunohistoquímica para p53 se asociaba a los tumores serosos ( $p=0,0006$ ) y a los tumores con un grado de diferenciación alto ( $p=0,04$ ), pero no encontró asociación con el estadio de la F.I.G.O y la edad. Sin embargo Diebold<sup>462</sup> afirma que la detección de p53 tiene un impacto pronóstico compatible con el estadio de la F.I.G.O. Asimismo la serie de Geisler y cols<sup>467</sup> mostró una relación significativa entre la expresión de proteína p53 con el estadio de la FIGO ( $p<0,001$ ) y el grado de diferenciación ( $p=0,039$ ).

### **6.3 c) La expresión de proteínas de bcl-2 y bax.**

La expresión de bcl-2 presentó una correlación negativa con el grado de diferenciación, el estadio de la FIGO y el grado nuclear ( $p<0,05$ ). La expresión de bax por su parte, presentó una correlación positiva con el el estadio de la FIGO y el grado nuclear ( $p<0,05$ ).

## **6.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA APOPTOSIS, EXPRESIÓN GENES IMPLICADOS EN SU CONTROL EN LOS CARCINOMAS DE OVARIO**

### **6.4 a) Índice apoptótico HE - Índice apoptótico T.U.N.E.L.**

Encontramos una correlación lineal entre la determinación del índice apoptótico en secciones H-E y la técnica de T.U.N.E.L. con un coeficiente de correlación de Spearman de 0,756 ( $p < 0,001$ ). Mc Menamin y cols<sup>468</sup>, encontraron también una buena correlación entre ambos métodos.

La valoración de la apoptosis por el método de marcaje *in situ* del DNA fragmentado ó técnica de T.U.N.E.L. (TdT- mediated dUTP nick end labelling) tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis, en secciones de tejido fijadas en parafina. Presenta como ventaja la detección de las células de apoptosis en estadios más precoces que la hematoxilina-eosina. Se pone de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación de DNA, incorporando nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción del enzima transferasa terminal (TdT).

Sin embargo, esta técnica no esta exenta de desventajas. Es cara y laboriosa requiriendo unas 7-8 horas para su realización. Además, puede presentar casos de falsos negativos en tejidos con defectos de fijación, y frecuentemente no detecta los cuerpos apoptóticos fácilmente detectables en las secciones de hematoxilina-eosina<sup>445</sup>. Por otro lado, puede que algunas células en mitosis, en necrosis o con fenómenos de autolisis incorporen los nucleótidos marcados, dando resultados falsos positivos y sobrevalorando el índice apoptótico<sup>443, 444</sup>.

La valoración de el índice apoptótico en secciones de hematoxilina-eosina, permite, además, contabilizar el índice mitótico en los mismos campos del tumor, dando una idea global y más fidedigna del comportamiento biológico que puede tener el tumor.

#### **6.4 b) I apoptótico-p53, bcl-2 y bax**

En los tumores de ovario, el índice apoptótico se correlaciona positivamente con la expresión de p53 y bax con coeficientes de correlación de Spearman de 0,528 y 0,297 respectivamente ( $p < 0,01$ ) y presenta una discreta correlación lineal negativa con la expresión de bcl-2, con coeficiente de Spearman de  $-0,192$  ( $p = 0,029$ ). Asimismo existe una correlación inversa entre la expresión de p53 y bcl-2 con un coeficiente de Spearman de  $-0,364$  ( $p < 0,001$ ), y una correlación positiva discreta entre la expresión de p53 y bax, coeficiente de 294 ( $p < 0,01$ ). Igualmente la correlación entre la expresión de bcl-2 y bax fue negativa (C Spearman =  $-0,185$ ) ( $p = 0,035$ ).

Yamasaki y cols <sup>469</sup> mostraron una relación inversa entre el índice apoptótico y la expresión de bcl-2, sin embargo no encontraron relación entre la apoptosis y la expresión de p53. En las series de Diebold <sup>462</sup> y Herod <sup>470</sup>, no hallaron correlación alguna entre el índice apoptótico p53 y bcl-2 en los carcinomas de ovario.

Sinicrope y cols <sup>471</sup> en los carcinomas de colon, y Silvestrini y cols <sup>472</sup> en los carcinomas de mama, encontraron una correlación negativa entre la expresión de bcl-2 y p53, como la presentada en nuestra serie. Igualmente, Chan <sup>452</sup> demuestra una correlación inversa estadísticamente significativa entre la expresión de p53 y bcl-2 en los carcinomas ováricos examinados.

Ozawa<sup>473</sup> en tumores de colon encontró una correlación positiva entre el índice apoptótico, la expresión de p53 y la expresión de bax en los carcinomas de tipo plano ( $p=0,08$ ). Sin embargo, presentó un porcentaje de casos con alta expresión de p53 y bcl-2 y nula expresión de bax acompañado de un índice apoptótico disminuido y un peor pronóstico. Nosotros encontramos algunos casos donde ocurrían estas circunstancias y coincidían con tumores de alto grado histológico, con un estadio III- IV de la F.I.G.O., de tipo seroso, endometrioides o de célula clara, asociado a cortas supervivencias. Esto sugiere que estos casos presentan una alteración del gen TP53 y una resistencia celular para la apoptosis.

Xie y cols<sup>474</sup>, en una serie de 85 carcinomas escamosos orales, demostraron que la expresión de bax se correlacionaba positivamente con el índice apoptótico, mientras que no encontró correlación entre el bcl-2 y la apoptosis.

## **6.5 FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS TUMORES DE OVARIO DE ESTIRPE EPITELIAL**

En los tumores de ovario de tipo epitelial se consideran como factores pronósticos clínicos: el estadio de la F.I.G.O., la presencia de enfermedad residual tras la cirugía, el volumen de ascitis, la edad y el estado general de la paciente<sup>3, 121, 122</sup>. Dentro de los factores patológicos, también se ha estimado como pronóstico: el tipo y grado de diferenciación histológico, así como el grado nuclear, la cantidad de necrosis, además de el índice de mitosis<sup>121, 122, 123</sup>. En nuestra serie el estudio univariado para el tiempo de supervivencia y para el periodo libre de enfermedad resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) para los siguientes factores pronósticos ya

establecidos: estadio de la F.I.G.O, edad, presencia de enfermedad residual tras la cirugía, el tipo y grado de diferenciación histológico, la cantidad de necrosis, el grado nuclear, e índice mitótico.

En este trabajo se han estudiado variables que reflejan el comportamiento biológico de los tumores ováricos, con el fin de identificar otros posibles factores pronósticos determinantes, como son: el índice apoptótico y algunos factores involucrados en su control (p53, el bcl-2 y el bax), así como la expresión de proteínas relacionadas en los mecanismos de vigilancia genómica e indirectamente en la apoptosis (p53 y rad-9).

### **6.5 a) El índice apoptótico**

En nuestra serie, el índice apoptótico ha resultado ser factor pronóstico en el análisis univariado, tanto considerando el tiempo de supervivencia (H-E:  $p < 0,001$  y T.U.N.E.L:  $p < 0,001$ ) como el periodo libre de enfermedad (H-E:  $p < 0,001$  y T.U.N.E.L:  $p < 0,001$ ). Estos resultados son similares a los encontrados por Yamasaki y cols <sup>469</sup> en una serie de 71 casos de tumores de ovario, donde correlacionaron significativamente un alto índice apoptótico, determinado mediante la técnica de T.U.N.E.L., con tiempos de supervivencia cortos ( $p < 0,017$ ). Asimismo, Mc Menamin y cols <sup>468</sup> en una serie de 30 carcinomas serosos de ovario, encuentran que un alto índice apoptótico, contabilizado en secciones de Hematoxilina-eosina, se correlaciona con peor pronóstico ( $p < 0,02$ ). Esta asociación también se ha encontrado en otro tipo de tumores como carcinomas de mama <sup>475</sup>, próstata <sup>476</sup>, ó vejiga <sup>477,478</sup>.

Si consideramos que el crecimiento tumoral se determina por el porcentaje de células en proliferación, el tiempo del ciclo celular y la cantidad de muerte celular, resultaría paradójico el conceptuar un elevado número de apoptosis como un factor adverso. Además, la apoptosis juega

un papel fundamental en la eliminación de células con un daño genético severo cuando fallan los mecanismos de reparación genómica, evitando así una transformación neoplásica.

Por otro lado, nuestros resultados indican, al igual que en la mayoría de las series hay una fuerte correlación lineal entre la apoptosis y la proliferación celular con un índice de Pearson de 0,6 ( $p < 0,000$ ), lo que demuestra que un alto índice apoptótico, al igual que un alto índice mitótico, es un signo de recambio celular en los tumores malignos agresivos, y que su traducción con un peor pronóstico es un mecanismo complejo.

En este sentido el gen c-myc puede jugar un papel importante, ya que estimula bien la proliferación o la apoptosis celular según las circunstancias, y su expresión se ha asociado a situaciones de alto recambio celular donde coexisten tanto la proliferación como la apoptosis<sup>479</sup>. Por otro lado, en los tumores con inestabilidad de genes reguladores del ciclo celular no se puede excluir que la apoptosis sea estimulada por algunas señales de crecimiento, como los factores de necrosis tumoral, o de las ciclinas quinasa-dependiente<sup>480</sup>. Sin embargo, también debe de tenerse en cuenta otros factores que pueden modificar o descontrolar esta susceptibilidad genética inherente al tumor, como pueden ser los fenómenos de isquemia o el componente inflamatorio tumoral que mediante los linfocitos citotóxicos activarían la apoptosis por vías extrínsecas.

Stauton<sup>398</sup> encontró que el índice apoptótico es superior al índice mitótico en casi todos los tumores con algunas excepciones como la leucemia mieloide aguda, el leiomioma y el carcinoma de células transicionales. Ioffe<sup>457</sup>, por su parte, describió este hallazgo en una serie de casos de endometriosis proliferativos, con hiperplasia simple, hiperplasia compleja y carcinomas. Nuestros resultados también ponen de manifiesto un mayor índice de apoptosis que de mitosis. Este fenómeno parece paradójico, ya que con este balance se terminaría en una pérdida total de células. La explicación radicaría en que el proceso de mitosis se completa más rápidamente que



el de apoptosis, donde los cuerpos apoptóticos pueden permanecer en el espacio extracelular hasta 8 horas siendo fagocitados por los macrófagos adyacentes<sup>402</sup>.

El índice de renovación, definido como índice mitótico menos índice apoptótico, fue descrito como marcador útil en el análisis de algunos linfomas<sup>238</sup> y en relación con factores pronósticos en algunos tumores sólidos como el neuroblastoma<sup>481</sup>, o el carcinoma de próstata<sup>238</sup>; sin embargo es un término que no ha tenido repercusión en la literatura especializada. En nuestra serie ninguno de los análisis estadísticos realizados con el índice de renovación, como supervivencia, o asociación, resultaron estadísticamente significativos.

### **6.5 b) La expresión de proteínas de p53**

Mediante análisis univariados de nuestros casos, la expresión de p53 ha resultado ser un factor pronóstico, tanto considerando el tiempo de supervivencia ( $p < 0,001$ ) como el periodo libre de enfermedad ( $p < 0,001$ ).

Los estudios de la expresión de p53 considerándola como factor pronóstico son contradictorios. Klemi y cols<sup>466</sup>, estudiaron la expresión de proteína p53 en 136 casos de carcinoma de ovario concluyendo que era un factor de mal pronóstico independiente. Igualmente los resultados en las series de Diebold<sup>462</sup>, apoyan su papel como factor pronóstico en los tumores de ovario ( $p = 0,0001$ ). También Shanin y cols<sup>482</sup> demuestran su relación con la supervivencia, tanto la expresión de la proteína como la mutación genética ( $p < 0,002$ ). Por el contrario, Herod<sup>470</sup> no encontró diferencias en la supervivencia entre grupos con poca, moderada o alta expresión de p53 ( $p = 0,45$ ). Yamasaki y cols<sup>469</sup> tampoco encontraron relación alguna entre la expresión de esta proteína y la supervivencia global en el estudio de su serie ( $p > 0,05$ ).

La variabilidad de resultados, podría explicarse debido a las diferentes técnicas y anticuerpos utilizados por los diferentes autores, y a la falta de consenso en la interpretación de los resultados, en años anteriores. Actualmente, se ha consensuado que el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína p53 humana clona DO-7, es el que discrimina más casos falsos positivos y negativos, y, además, no presenta heterogeneidad intratumoral <sup>417, 482</sup>. Nosotros hemos utilizamos el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína p53 humana, clona DO-7 en una dilución 1:10 (DAKO), que es la utilizada actualmente por la mayoría de los autores <sup>417, 482</sup>.

La fosfoproteína p53 es un factor de transcripción que controla numerosos genes involucrados en la regulación del ciclo celular. La proteína p53 en condiciones normales tiene una vida media muy corta y es indetectable por inmunohistoquímica. Sin embargo, ante la presencia de daño celular irreparable la estabilización de esta proteína activa la apoptosis a través de la transcripción del gen pro-apoptótico bax. Por otro lado, cuando se produce una mutación del gen Tp53, tiende a acumularse en el núcleo el producto protéico afuncional que tiene mayor vida media, y que igualmente se expresa mediante inmunohistoquímica.

Es importante destacar que algunos autores como Diebold <sup>462</sup> consideran que la expresión de p53 implica la alteración genética del TP53, ya que basándose en el estudio de Kyrprjanczik y cols <sup>483</sup>, alrededor del 80 % de las mutaciones encontradas en los tumores ováricos se asocian a la expresión de proteína p53. Además, estos autores concluyen que la progresión tumoral esta gobernada por la pérdida de función del gen TP53. Logullo y cols <sup>417</sup> proponen un estudio integrado entre la expresión de p53 y el estudio molecular del gen TP53 para confirmar tal asociación. En un reciente estudio, Shanin y cols <sup>482</sup> analizaron en 171 casos de carcinoma de ovario, la expresión de proteína p53 mediante inmunohistoquímica y el análisis mutacional del gen TP53 en todos los casos. Encontraron una concordancia entre los dos métodos del 71,3 %

( $p < 0,001$ ) y postularon que la positividad inmunohistoquímica del p53 se debe tanto a los casos con mutaciones del gen TP53 como al acúmulo de proteína funcionante por defecto en su degradación a través de la MDM2 ante situaciones de grave daño genético. El elevado porcentaje de correlación entre ambos hallazgos, se debe a que la mayoría de los casos de tumores de ovario con alteración del gen p53 en los carcinomas de ovario se ha encontrado en estadios avanzados (F.I.G.O III-IV)<sup>484</sup>, y de la serie de Shanin <sup>482</sup> el 71,1 % de los casos correspondían a estos estadios. En nuestra serie el 37,7 % de los casos presentaba un estadio III-IV de la F.I.G.O.

En los casos donde la alteración genética produzca una proteína defectuosa, no se produciría la vía de activación apoptótica mediante bax, disminuyendo la tasa de apoptosis y, por tanto, favoreciendo así un mayor crecimiento celular. Por ello, la expresión inmunohistoquímica de p53 en nuestra serie, no parece que se deba en tan alto porcentaje a una mutación del gen TP53, ya que existe una importante asociación entre la expresión de p53 y la expresión de bax ( $p=0,012$ ) y, a su vez, el índice apoptótico ( $p=0,013$ ). Esto significa que la proteína p53 estaría estimulando la sobreexpresión de bax provocando la apoptosis celular, teniendo en cuenta, además, que no se conoce otra vía de activación de la proteína bax. Por otro lado, en el estudio de pérdida de heterocigocidad realizado en un 10 % de nuestros casos, sólo uno presentó pérdida alélica, el cual presentaba expresión de p53 en más del 75 % de las células tumorales, nula expresión de bax, y un índice apoptótico disminuído. El resto de casos presentaba ambos alelos del gen TP53 y correspondían a casos de carcinoma seroso papilar con alta expresión de p53 y de bax, con un índice apoptótico alto.

### **6.5 c) La expresión de proteínas bcl-2 y bax**

En análisis univariados realizados en nuestra serie, la expresión de bcl-2 ha resultado ser un factor pronóstico. Una alta expresión de bcl-2 se asocia a largas supervivencias (  $p=0,0123$  ) y periodos libre de enfermedad ( $p=0,002$ ). Sin embargo, no se identificaron diferencias significativas en la supervivencia (  $p= 0,1294$ ), ni en el periodo libre de enfermedad ( $p= 0,314$ ) según los grupos de expresión de la proteína bax.

En la mayoría de las series de carcinomas de ovario donde se ha estudiado la apoptosis, sólo se ha analizado la expresión de bcl-2 y de p53. Respecto a la expresión de bcl-2 como factor pronóstico, la serie de Henriksen y cols<sup>485</sup> ( $p=0,02$ ) apoya nuestros resultados; sin embargo los resultados de Diebold<sup>462</sup>, Herod<sup>470</sup> Yamasaki<sup>469</sup> no fueron estadísticamente significativos ( $p >0,05$ ). Estos resultados se deben a que tanto nuestra serie como la de Henriksen<sup>485</sup> consideramos los tumores ováricos en general, incluyendo un porcentaje considerable de tumores benignos y de tumores borderline, mientras que las series de Diebold<sup>462</sup>, Herod<sup>470</sup> y Yamasaki<sup>471</sup> consisten en una mayoría de casos de carcinoma y escaso número de tumores borderline.

Por otro lado, no existen muchos trabajos que hayan estudiado la expresión de bax como factor predictor de supervivencia o de periodo libre de enfermedad en los tumores de ovario. Lohmann<sup>486</sup> en 50 tumores de ovario no encontró significación estadística entre la expresión de bax con la supervivencia ( $p= 0,55$ ), lo que concuerda con nuestros resultados.

En otros tumores se han visto resultados contradictorios; en los linfomas no hodgkin de bajo grado existe una expresión de bcl-2 intensa que se pierde en los que se transforman a alto grado<sup>487</sup>; los carcinomas anaplásicos de tiroides tienen una baja expresión de bcl-2, mientras que los carcinomas mejor diferenciados presentan una alta expresión de bcl-2<sup>488</sup>. Además, se ha demostrado que los tumores de pulmón de célula grande con alta expresión de bcl-2 tienen una

supervivencia global post-tratamiento superior a los que presentaban baja expresividad de bcl-2<sup>489</sup>. Lu y cols<sup>490</sup> observaron un significado variable de expresión de bcl-2 en diferentes tipos de tumores; mientras que en tumores de mama y pulmón presenta un pronóstico favorable, en los carcinomas de próstata se asociaban a mal pronóstico.

Todo indica que la inducción de la apoptosis por vía mitocondrial, que involucra la familia bcl-2, es muy compleja, y que la influencia de cada proteína puede variar de tumor a tumor.

Acorde con nuestros resultados se evidencia que la expresión de la proteína bcl-2 se asociaría con un mejor pronóstico, lo que es coherente con los hallazgos de un elevado índice apoptótico en los casos de peor pronóstico, en vista a la relación inversa que tiene la expresión de bcl-2 con la frecuencia de apoptosis. Sin embargo, parece paradójico que la proteína bcl-2, la cual inhibe la apoptosis, esté asociada a un mejor pronóstico. Esto podría explicarse ya que la expresión de bcl-2 también se ha visto asociada a un menor crecimiento celular en líneas celulares de cáncer colorectal<sup>491</sup>. La pérdida de expresión de bcl-2 podría indicar un fenotipo más agresivo permitiendo un crecimiento celular más acelerado ante la presencia de cambios en la proteína p53.

#### **6.5 d) Papel de la apoptosis y factores involucrados en su regulación como factores de quimioresistencia.**

Se ha visto que el efecto de todos los fármacos quimioterápicos en las células del carcinoma ovárico sería la muerte celular programada. Por ello a pesar de que la quimiorresistencia es un fenómeno multifactorial, parece que el signo común es el fallo de la célula tumoral para entrar en un programa de muerte celular<sup>492</sup>.

Se conocen varios factores asociados a la quimioresistencia en los tumores de ovario<sup>493</sup>:

- a) Los cambios en el nivel de glutathion S-transferasa parecen un factor importante en el desarrollo de la resistencia al cisplatino
- b) El aumento de la expresión de la glicoproteína –P, se ha asociado con la resistencia a los taxoides
- c) El aumento de la expresión de la proteína citoplasmática LRP (lung resistance protein).
- d) La inactivación de la proteína p53, por mutación de su gen se ha relacionado con la resistencia a carboplatino.

Stauton y cols<sup>398</sup> encontraron que algunos tumores con buena respuesta a la quimioterapia, como el carcinoma de célula pequeña, el sarcoma de Ewing o el linfoma de Burkitt, tenían un índice apoptótico elevado, mientras que el melanoma y algunos tumores de crecimiento indolente como el carcinoma folicular de tiroides presentaban un índice apoptótico bajo. Wheeler encontró que los tumores de cérvix que presentan un elevado número de apoptosis responden mejor a la radioterapia<sup>494</sup>.

Sin embargo, no hay evidencias relevantes en estudios in vivo, que el índice apoptótico pueda ser útil para predecir la respuesta terapéutica. Además los agentes quimioterápicos inducen la apoptosis por diferentes mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de bcl-2 o la mutación de p53, siendo complejos de entender debido a la heterogeneidad intratumoral.

La regulación negativa del p53 sobre el ciclo celular puede ocurrir ante diferentes tipos de agresiones en el ADN, como son la radioterapia o quimioterapia, aumentando entonces la cantidad de la proteína nuclear p53. La consecuencia inmediata del incremento de p53 sería la detención del ciclo celular en fase G1, permitiendo así actuar a los mecanismos de reparación del

ADN. Si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 podría inducir el inicio de la apoptosis, como ya se ha comentado. Así, la quimio y radioterapia, a dosis no letales por genotoxicidad, son capaces de inducir apoptosis siempre y cuando esté presente y sea activa funcionalmente la p53.

El bcl-2 se ha descrito como un gen resistente a la quimio-radioterapia debido a la habilidad que confiere a la célula para resistir la muerte apoptótica después de la terapia<sup>495</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión de bax predispone a la apoptosis, lo que aumenta la susceptibilidad celular a los agentes quimioterápicos.

Perego y cols.<sup>496</sup> hallaron, en líneas celulares de carcinoma ovárico, una asociación entre la resistencia a cisplatino, la mutación del gen TP53 y una expresión reducida de la proteína bax. Además, en estudios de terapia génica, se ha realizado la transfección del gen bax en líneas celulares con TP53 mutado, favoreciendo así la apoptosis lo que podría ser considerado como una posible futura arma génica que aumente la eficacia de los quimioterápicos<sup>497</sup>. La relación existente entre el bcl-2 y el bax parece importante ya que la formación de heterodímeros bcl-2/bcl-2 o bc-2/bax favorecería la supervivencia celular, mientras que, por el contrario, el heterodímero bax-bax la apoptosis.

Sin embargo, los estudios de esta relación parecen controvertidos. Lohmann<sup>486</sup> estudió en 50 carcinomas de ovario, la expresión inmunohistoquímica del bcl-2 y de los índices bcl-2:bax, y bcl-2:bcl-x mediante citometría de imagen con el fin de determinar la respuesta al tratamiento y el pronóstico. Sus resultados no fueron significativos ( $p=0,15$ ,  $p=0,83$  y  $p=0,93$  respectivamente). Por otro lado, Mano y cols.<sup>498</sup> evaluaron la expresión de bcl-2 en 66 pacientes con carcinoma de ovario en estadio avanzado, y encontraron una correlación inversa entre la expresión de bcl-2 con la respuesta al tratamiento, demostrando peores curvas de supervivencia a mayor expresión de bcl-

2 ( $p=0,0064$ ), especialmente en los tipos serosos y endometrioides . Xie <sup>474</sup> en una serie de carcinomas escamosos orales determina que una alta expresión de bax , con baja o nula de bcl-2 debería de ser interpretada como indicador de una buena respuesta al tratamiento.

Por ello, creemos que la presencia de un tumor con un índice apoptótico alto, relacionado con expresión de proteína p53 y de bax , y, además, baja expresión de bcl-2 previa al tratamiento, sugiere una propensión intrínseca a la apoptosis y por tanto una favorable respuesta a la quimioterapia.

### **6.5 e) Análisis estadístico multivariado.**

En el modelo de regresión de cox, considerando el tiempo de supervivencia , se establecieron como variables independientes: la edad, el estadio de la F.I.G.O y el índice apoptótico siendo estadísticamente significativas con un  $p=0,026$ ,  $p= 0,017$  y  $p= 0,019$ , respectivamente. Al analizar el periodo libre de enfermedad, resultaron como variables independientes: la edad, el estadio de la F.I.G.O, el grado de necrosis y la expresión de proteína p53, siendo estadísticamente significativas con un  $p=0,01$ ,  $p=0,038$ ,  $p=0,023$  y  $p=0,005$  respectivamente.

Nuestros resultados, para el periodo libre de enfermedad, coinciden con la serie de Diebold <sup>462</sup> , quien encontró como variables independientes :el estadio de la FIGO ( $p=0,0006$ ) y la expresión de proteína p53 ( $p=0,0005$ ). Asimismo, en la serie de Geisler y cols <sup>467</sup> , con 103 casos de carcinoma de ovario con un seguimiento de 60 meses, resultaron variables pronósticas independientes la expresión de p53 ( $p= 0,0032$ ), estadio de la FIGO ( $p<0,0001$ ), y el nivel de citorreducción ( $p< 0,0001$ ).



Mano y cols.<sup>499</sup> encontraron a la enfermedad residual, tamaño del tumor, tipo histológico y el bcl-2 como factores pronósticos independientes ( $p < 0,001$ ), en una serie de 66 carcinomas de ovario en estadio III y IV de la F.I.G.O. Por su lado, Yamasaki y cols.<sup>469</sup> hallaron como factores independientes sólo el estadio de la FIGO ( $p = 0,0395$ ) y el índice mitótico ( $p = 0,0387$ ), encontrando que tanto el alto el índice apoptótico como el menor grado de diferenciación histológico se relacionaban con supervivencias cortas, pero no eran factores pronósticos independientes. Nuestros resultados mostraron como factor independiente para la supervivencia, el índice apoptótico, además de la edad y el estadio de la F.I.G.O., siendo el índice mitótico significativo en el estudio univariado, pero no para el modelo de regresión de cox. Por ello, creemos que se debe valorar tanto el índice mitótico, como el apoptótico, para entender el comportamiento biológico del tumor.

## **6.6 EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE CHECKPOINT EN LOS TUMORES OVARICOS DE ESTIRPE EPITELIAL**

Las células eucariotas están expuestas a agentes de origen fisiológico y/o patológico que dañan el material genético. El daño en el DNA dispara varios mecanismos de respuesta en la célula. Uno de ellos es una parada en el ciclo celular, que da tiempo a los mecanismos de reparación a actuar sobre el DNA dañado. Un fallo en estos mecanismos de “checkpoint” puede resultar en una inestabilidad genómica<sup>424</sup>. El caso más claro de conexión entre falta de “checkpoint”, inestabilidad genómica y cáncer es el de la proteína p53, implicada en el proceso de respuesta al daño en el DNA. En células eucariotas superiores la acumulación de mutaciones ha sido propuesta como una de las causas fundamentales de aparición de cáncer. La existencia de

la mutación en un solo gen que incrementa el número de mutaciones en el genoma (como por ejemplo, p53), podría provocar, por tanto, una predisposición hacia procesos cancerígenos<sup>421</sup>.

Las proteínas humanas implicadas en este control (grupo de las Rads) se denominan hRad1, hHus1, hRad9, hRad17, ATM y ATR. Estudios genéticos en levaduras demuestran que todas estas proteínas actúan a un nivel cercano al daño en el DNA (es decir, reconocen directamente el daño o interactúan con proteínas que reconocen el daño en el DNA), mientras que existen otras dos proteínas por debajo de ellas en una cascada de eventos que conducen a la parada del ciclo celular; éstas son las proteína-quinazas hChk1 y hChk2 . Estas dos proteínas quinazas parecen ser efectoras y establecer la conexión entre la maquinaria de checkpoint en respuesta al daño en el DNA y la de progresión del ciclo celular (ciclina y proteínas quinazas dependientes de ciclina).

Las proteínas de checkpoint, hRad1, hHus1 y hRad9 presentan homología con un factor de replicación (PCNA) e interactúan formando complejos de función desconocida en la célula. La p53 bloquea el ciclo celular mediante la inducción de la proteína p21 inhibidora de cinasas dependientes de ciclina, bloqueando la transición G1-S y bloqueando la replicación del ADN en fase S del ciclo, inhibiendo la actividad de las proteínas de PCNA sobre la ADN polimerasa  $\delta$ . La PCNA junto con hus1, rad-9 y otras proteínas de checkpoint actúan como mecanismos de reparación, que no resulta inhibida por la p21<sup>499</sup>.

No se han publicado, hasta el momento, estudios de expresión de estas proteínas de checkpoint y su relación con la supervivencia. En el caso de hRad17, se ha descrito como sobreexpresada en determinados cánceres de colon<sup>427</sup>, y, por el contrario, no se encuentra presente en casos de cáncer de testicular<sup>428</sup>.

En el análisis univariados de nuestra serie, no se identificaron diferencias significativas en la supervivencia según los grupos de expresión para hus-1 ( $p= 0,4031$ ), ni para rad-9 ( $p=0,3246$ ). Igualmente tampoco fueron estadísticamente significativo analizando el periodo libre de enfermedad según los grupos de expresión para hus-1 ( $p= 0,6428$ ), ni para rad-9 ( $p=0,5383$ ). Sin embargo, si parecen existir diferencias de expresión entre los diferentes grados de malignidad. La expresión de hus-1 y rad 9 en el 100 % de los casos de tumores benignos, era nula-baja. Los tumores borderline presentan un considerable porcentaje de casos con expresión de proteínas de “checkpoint” moderada. En los tumores malignos, por su parte, presentan una expresión moderada-alta en la mayoría de los casos que es estadísticamente significativo para el hus-1 ( $p<0,000$ ), pero no así para el rad-9 ( $p=0,146$ ). Nuestros resultados demuestran que estas proteínas se expresan en mayor porcentaje de células en los tumores malignos, que en los benignos. Este hecho puede ser debido a un acumulo de proteína nuclear ante un daño genético con el fin de cumplir su objetivo de control, de parada del ciclo y de reparación como ocurre con la proteína p53 activa, o por el contrario, que al igual que ocurre con la alteración del gen TP53 este produciendo una proteína anómala y afuncionante con mayor vida media. Estudios moleculares de estos genes en material en fresco deben de realizarse para valorar la causa de dicha expresión. Por otro lado, no se observaron grandes diferencias entre los tipos histológicos. La mayoría de los casos presentaban una positividad moderada para el hus-1 exceptuando los tumores benignos, que presentaban nula o bajo % ( $p<0,000$ ), y para el rad-9 aunque no era estadísticamente significativo ( $p= 0,230$ )

También, se objetivo que la expresión de hus-1 presentó una correlación positiva con el estadio de la FIGO y el grado nuclear, mientras que la expresión de rad-9 sólo presentó una

correlación positiva con el grado nuclear, lo que significa un mayor acúmulo de estas proteínas en tumores de alto grado nuclear .

Estudios recientes en eucariotas superiores han establecido, además, una conexión entre alguno de estos genes y p53. Deficiencias en el proceso de checkpoint en respuesta a daño en el DNA se relacionan con inestabilidad genómica en varios organismos. Se ha descrito que líneas celulares con el gen de Hus1 interrumpido presentan un alto porcentaje de alteraciones<sup>500</sup>. También se han establecido conexiones entre estos genes y procesos cancerígenos, en concreto deficiencias en el gen que codifica la proteína ATM provocan una enfermedad genética recesiva, la ataxia telangiectasia, que se caracteriza porque los individuos que la padecen presentan degeneración del sistema nervioso central, deficiencias en el sistema inmune y propensión al cáncer. También se ha descrito que hChk2, se presenta mutada en un porcentaje bajo de los casos de un síndrome degenerativo humano caracterizado por alto riesgo de tumores, el síndrome de Li-Fraumeni, en el que aproximadamente un 80% tienen mutado el gen supresor tumoral p53<sup>422</sup>. Además, hRad1, hHus1 y hRad9 son un grupo de proteínas que interaccionan entre sí, y que se especula formen en la célula un heterotrímero. Debido a su reciente caracterización en células humanas, su función específica no se encuentra totalmente definida. Sin embargo, otros datos recientes las relacionan con procesos de apoptosis. Por ejemplo, la sobreexpresión de hRad9 en células humanas induce apoptosis y ésta puede ser rescatada por la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sup>431</sup>. El mecanismo molecular de este efecto es la interacción entre ambas proteínas (hRad9 y Bcl-2/x) a través de un dominio BH3<sup>432</sup>.

Estudiamos si en los tumores ováricos de nuestra serie existía alguna relación entre estas proteínas de “checkpoint” y los factores reguladores de apoptosis que habíamos valorado. La expresión de proteína hus-1 se correlaciona positivamente con el índice apoptótico (C Spearman

=0,294; p=0,02) , con la expresión de p53 (C Spearman = 0,294; p=0,01) y bax (C Spearman =0,245; p=0,01), además de la expresión de rad-9 (C Spearman = 0,339; p < 0,00). Por el contrario la expresión de rad-9 sólo se correlaciona con la expresión de hus-1.

La correlación descrita entre el bcl-2 y el rad-9 en células humanas <sup>431</sup> , no se ha establecido en la serie de tumores de ovario. Sin embargo la proteína hus-1 presentó una relación positiva discreta con los factores pro-apoptóticos, por lo que podemos pensar que podría actuar como un mecanismo de vigilancia, y estar relacionada, en cierta medida, con la función de la p53.

## **7-CONCLUSIONES**

## **7-CONCLUSIONES :**

El estudio de la apoptosis y de la expresión de proteínas involucradas en su control y en los mecanismos de vigilancia genómica, en los tumores de ovario de estirpe epitelial nos ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

- 1- La proteína anti-apoptótica bcl-2 presenta una alta expresión en la mayoría de los tumores benignos y borderline ( $p= 0,032$ ), mientras que la proteína pro-apoptótica p53 se expresa en mayor porcentaje en los tumores malignos ( $p<0,001$ ). Los tumores malignos de ovario presentan un índice apoptótico superior a los tumores “borderline” y a los tumores benignos ( $p<0,001$ ).
- 2- Existen diferencias significativas en la expresión de los genes reguladores de la apoptosis, y en el índice apoptótico entre los diferentes tipos histológicos ( $p<0,001$ ). Los tumores de ovario de tipo histológico mucinoso presentan una baja susceptibilidad a la muerte celular programada en comparación con los otros tipos histológicos, presentando una baja expresión de proteínas pro-apoptóticas p53 y bax ( $p<0,001$ ). El carcinoma seroso papilar destaca por una alta expresividad de la proteína pro-apoptótica p53 en relación a otros tipos histológicos ( $p<0,001$ ) y el carcinoma de célula clara presenta mayor expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-2 en comparación con otros carcinomas ( $p=0,034$ ).

- 3- El índice apoptótico y la expresión de la proteína p53, presentan una correlación positiva estadísticamente significativa con otros factores pronósticos clínico-patológicos ya establecidos, como el estadio de la F.I.G.O. y el grado de diferenciación histológica ( $p < 0,05$ ). Asimismo la expresión de bcl-2 presenta una correlación negativa con estos mismos factores pronósticos ( $p < 0,05$ ).
  
- 4- El estudio univariado para el tiempo de supervivencia y el periodo libre de enfermedad en los tumores de ovario de tipo epitelial es estadísticamente significativo para el índice apoptótico, así como para la expresión de p53 y bcl-2 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la expresión de la proteína pro-apoptótica bax y la de proteínas de vigilancia genómica hus-1 y rad-9 no fueron significativas en relación al pronóstico ( $p > 0,05$ ).
  
- 5- El análisis multivariado de los factores estudiados para el tiempo de supervivencia, nos ha permitido seleccionar el índice apoptótico como variable pronóstica independiente de supervivencia ( $p = 0,019$ ). Consideramos que la evaluación del índice apoptótico, al igual que la del índice mitótico, es útil para establecer la cinética celular del tumor, y por ende, entender el comportamiento biológico del mismo.



- 6- El análisis multivariado de los factores estudiados para el periodo libre de enfermedad nos ha permitido seleccionar la expresión de la proteína p53 como variable pronóstica independiente. Establecemos que el porcentaje de células tumorales con expresión de la proteína p53 determinada por inmunohistoquímica permitiría predecir la predisposición tumoral a la recurrencia y/o a la capacidad de metastatizar ( $p=0,005$ ).
  
- 7- El método más adecuado para la valoración del índice apoptótico es el recuento celular en las secciones de Hematoxilina-Eosina, ya que presenta una alta correlación positiva con el índice apoptótico contabilizado mediante la técnica del T.U.N.E.L, (Coeficiente de correlación de Pearson = 0,756.  $p<0,001$ ). Además es una técnica más barata, fácil de realizar y que permite valorar el contexto y contabilizar el índice apoptótico y el mitótico.
  
- 8- La expresión de las proteínas de vigilancia genómica o “checkpoint”, hus-1 y rad-9 es alta en los carcinomas, y baja-moderada en los tumores borderline y en los cistoadenomas benignos, siendo estadísticamente significativo para el hus-1 ( $p<0,001$ ), pero no para el rad-9 ( $p=0,146$ ).

9- La expresión de la proteína hus-1 presenta una correlación positiva con los factores pro-apoptóticos, tanto con la expresión de p53 ( $p=0,01$ ) como con la expresión de bax ( $p=0,01$ ). Además se relaciona con el índice apoptótico ( $p=0,02$ ). Sin embargo no se encontró ninguna relación con la expresión de bcl-2. Consideramos que la expresión de hus-1 en los carcinomas podría actuar como mecanismo de vigilancia de la integridad genómica y, por tanto, tener el mismo valor funcional que la proteína p53.

## **8-BIBLIOGRAFÍA**

## **8-BIBLIOGRAFÍA**

---

- <sup>1</sup> Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics,1993. CA Cancer J Clin 1994; 44: 7-26.
- <sup>2</sup> Look KY. Epidemiology, etiology, and screening of ovarian cancer. En: Rubin SC, Sutton GP, eds. Ovarian Cancer. New York:McGraw-Hill,1992:175-187.
- <sup>3</sup> Canistra SA. Cancer of the Ovary. N Engl J Med 1993; 329 : 1550-1559.
- <sup>4</sup> Botella Llusia J. Seis preguntas sobre el cancer de ovario. Acta Gin 2000; 54 :259-262.
- <sup>5</sup> Rulin MC, Preston AL. Adnexal masses in postmenopausal women. Obstet Gynecol 1987;70-578-581.
- <sup>6</sup> Sparks JM, Varner RE. Ovarian cancer screening. Obstet Gynecol 1991; 77: 787-793.
- <sup>7</sup> Young RC, Walton LA, Ellenberg SS. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer : Results of two randomized trials. N Engl J Med 1990; 332: 1021-1027.
- <sup>8</sup> Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumors of the ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian tube, and Broad Ligament. AFIP; 1998 .
- <sup>9</sup> Baker TG, Sum W. Development of the ovary and oogenesis. Clin Obstet Gynecol 1976; 3: 3-26.
- <sup>10</sup> Hoang-Ngoc M, Smadja A, Herve De Sigalony JP, Orcel L. Etude histologique de la gonade a diferenciatio ovarienne au cours de l'organogenese. Arch Anat Cytol Pathol 1989; 37:201-207.
- <sup>11</sup> Fukuda O, Miyayama Y, Fujimoto T, Okamura H. Electrón microscopic study of gonadal development in early human embryos. Prog Clin Biol Res 1989; 296:23-29.
- <sup>12</sup> Pinkerton JH, Mckay DG, Adams EC, Hertic AT. Development of the human ovary- a study using histochemical techniques. Obstet Gynecol 1961; 18: 152-81.

- 
- <sup>13</sup> Satoh M. Histogenesis and organogénesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 1991; 177: 85-107.
- <sup>14</sup> Gondos B. Cellular interrelationship in the human fetal ovary and testis. En: Federoff S ed. *Prog Clin Biol Res*, volume 59 b. Eleventh international congress of anatomy:Advances in the morphology of cells and tissues. New York: Alan R.Liss Inc, 1981:373-81.
- <sup>15</sup> Gondos B. Surface epithelium of the developing ovary. Possible correlation with ovarian neoplasia. *Am J Pathol* 1975; 81: 303-321.
- <sup>16</sup> Rabinovici J, Jaffe RB. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev* 1990; 11:532-557.
- <sup>17</sup> Van Wagenen G, Simpson ME, eds. *Embryology of the ovary and testis, Homo sapiens and Macaca mulatta*. New Haven: Yale University Press; 1965.
- <sup>18</sup> Clement PB. Embryology and histology of the ovaries.En: Sternberg SS, eds. *Histology for Pathologist*. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia ;1997 929-960.
- <sup>19</sup> Santesson L. Suggested clasification of ovarian tumours presented at meeting of the cancer commites of FIGO.; 1961 Aug 14. Stockolm.
- <sup>20</sup> Serov SF, Scully RE, Sobin LH, eds. *Histological typing of ovarian tumors*. Geneve, world Health Organization, 1973.
- <sup>21</sup> Di Saia PH J, Creasman WT, eds. *Clinical Gynecologic Oncology*. St Louis, Mosby Company; 1981.
- <sup>22</sup> McGowan L, ed. *Gynecologic Oncology*. New York. Appleton-Century Crofts;1978.
- <sup>23</sup> Koonings PP, Campbell AC, Mishell DR, Grimes DA. Relative frecuency of primary ovarian neoplasm: A 10-year review. *Obstet Gynecol* 1989; 74:921-926.
- <sup>24</sup> Russell P. Surface epithelial-stromal Tumors of the Ovary . In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's Pathology of the female genital Tract*. New York: Springer-Verlag,1994: 705-782.
- <sup>25</sup> Bell DA, Scully RE. Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. *Cancer* 1994;73:1859-1864.

- 
- <sup>26</sup> Mittal KR, Zeleniuch-Jacquotte A, Cooper JL, Demopoulos RI. Contralateral ovary in unilateral ovarian carcinoma: a search for preneoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12:59-63.
- <sup>27</sup> Resta L, Russo S, Colucci GA, Prat J. Morphologic precursor of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 181-186.
- <sup>28</sup> Scully RE. Ovary. In: Henson DE, Albores-Saavedra J, ed. *Pathology of incipient neoplasia*. Philadelphia: WB Saunders;1993.p.283-300.
- <sup>29</sup> Bourne TH, Whitehead MI, Campbell S. Ultrasound screening for familial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1991;43:927-932.
- <sup>30</sup> Werness BA, Afify AM, Bielat KL, Eltabbakh GH, Piver MS, Paterson JM. Altered Surface and Cyst Epithelium of Ovaries removed Prophylactically From Women With a family history of Ovarian Cancer. *Hum Pathol* 1999; 30: 151-157.
- <sup>31</sup> Scully RE. Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesion. *Int J Gynecol Obstet* 1995;49:9-15.
- <sup>32</sup> Bell DA, Scully RE. Benign and borderline serous lesions of the peritoneum in women. *Pathol Annu* 1989 ;24:1-21.
- <sup>33</sup> Russell P .Ovarian epithelial tumors with atypical proliferation. En: Lowe D, Fox H, eds. *Advances in Gynaecological pathology* .2<sup>nd</sup> edition. Edinburgh, Churchill livingstone;1992.p.299-230.
- <sup>34</sup> Burks Rt, Sherman ME, Kurman RJ.Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors.*Am J Surg Pathol* 1996;20:319-330.
- <sup>35</sup> Seidman JD, Kurman RJ. Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A clinicopathologic study of 65 advanced stage cases. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1331-1345.
- <sup>36</sup> Eichhorn JH, Bell DA, Young RH, Scully RE. Ovarian Serous Borderline Tumors with micropapillary and cribriform Patterns. *Am J Surg pathol* 1999; 23: 397-409.
- <sup>37</sup> Silva EG, Kurman RJ, Rusell P, Scully RE. Symposium : Ovarian tumors of borderline malignancy. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:281-

---

302.

<sup>38</sup> Prat J. Ovarian Tumors of borderline malignancy (Tumors of low malignant potential): A critical Appraisal. *Adv Anat. Pathol* 1999;6:247-274.

<sup>39</sup> Goldstein NS, Ceniza N. Ovarian Micropapillary Serous Borderline Tumors. *Am J Clin Pathol* 2000;114:380-386.

<sup>40</sup> Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian serous Borderline Tumors: A Critical Review of the Literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum Pathol* 2000; 31: 539-557.

<sup>41</sup> Tavassoli FA. Serous tumor of low malignant potential with early stromal invasion (serous LMP with microinvasion). *Mod Pathol* 1988;1:407-414.

<sup>42</sup> Bell DA, Scully RE. Ovarian serous borderline tumors with stromal microinvasion: a report of 21 cases. *Hum Pathol* 1990; 21:397-403.

<sup>43</sup> Moore WF, Bentley RC, Berchuck A, Robboy SJ. Some mullerian inclusion cyst in lymph nodes may sometimes be metastases from serous borderline tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 710-718.

<sup>44</sup> Bell DA, Weinstock MA, Scully RE. Peritoneal implants of serous borderline tumors: Histologic features and prognosis. *Cancer* 1988;62:2212-2222.

<sup>45</sup> De Nictolis M, Montirini R, Tommasoni S, Carinelli S, Matias Guiu X, Prat J. Serous borderline tumors of the ovary: A Clinicopathologic, immunohistochemical and quantitative study of 44 cases. *Cancer* 1992; 70:152-160.

<sup>46</sup> Scully RE, Silva E. Pathology of ovarian cancer. In: Gershenson DM, McGuire WP, eds. *Ovarian Cancer. Controversies in management*. New York: Churchill Livingstone; 1998.p.425-444.

<sup>47</sup> Bell DA. Ovarian Surface Epithelial-Stromal Tumors. *Hum Pathol* 1991; 22: 750-762.

<sup>48</sup> Russell P. The pathological assessment of ovarian neoplasm. I: Introduction to the common epithelial tumours and analysis of benign epithelial tumours. *Pathology* 1979;11 :251-282.

<sup>49</sup> Hunter V, Barnhill D, Jadwin D, Crooks L. Ovarian mucinous

---

cystadenocarcinomas of low malignant potential associated with a mature cystic teratoma. *Gynecol Oncol* 1988;29:250-254.

<sup>50</sup> Seidman JD, Elsayed AM, Sobin LH, Tavassoli FA. Association of mucinous tumors of the ovary and appendix. A clinicopathologic study of 25 cases. *Am J Surg Pathol* 1993;17:22-34.

<sup>51</sup> Chen KT. Female genital tract tumors in Peutz-Jeghers syndrome. *Hum Pathol* 1986; 17:858-861.

<sup>52</sup> Young RH, Scully RE. Mucinous ovarian tumors associated with mucinous adenocarcinoma of the cervix. A clinicopathological analysis of 16 cases. *Int J Gynecol Pathol* 1988; 7: 99-111.

<sup>53</sup> De Nictolis M, Di Loreto C, Cintis S, Prat J. Fibrosarcomatous mural nodule in ovarian mucinous cystadenoma: Report of a case. *Surg Pathol* 1990; 3: 309-315.

<sup>54</sup> Tsujimura T, Kawano K. Rhabdomyosarcoma coexistent with ovarian mucinous cystadenocarcinoma: A case report. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11: 58-62.

<sup>55</sup> Prat J, Scully RE. Ovarian mucinous tumors with sarcoma-like mural nodules. *Cancer* 1979; 44:1327-1331.

<sup>56</sup> Matias-Guiu X, Aranda I, Prat J. Immunohistochemical study of sarcoma-like mural nodules in a mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Virchows Archiv Pathol Anat* 1991; 419:89-92.

<sup>57</sup> Prat J, Young RH, Scully RE. Ovarian Mucinous Tumors with foci of anaplastic carcinoma. *Cancer* 1982; 50: 300-304.

<sup>58</sup> Nogales F, Herraiz M. Tumores epiteliales comunes de ovario. En: *El ovario. Fisiología y Patología*. Botella J, eds. Diaz de Santos. Madrid 1995.p.327-354.

<sup>59</sup> Hart WR. Ovarian epithelial tumors of borderline malignancy (Carcinoma of low malignant potential). *Hum Pathol* 1977; 8:541-549.

<sup>60</sup> Rutgers JL, Scully RE. Ovarian mullerian mucinous papillary cystadenomas of borderline malignancy. A clinicopathologic analysis. *Cancer* 1988; 61:340-348.

<sup>61</sup> Matias Guiu X, Prat J. Ovarian Tumors with functioning stroma: An immunohistochemical study with hCG mono and polyclonal antibodies.



---

Cancer 1990; 65:2001-2005.

<sup>62</sup> Riopel MA, Ronnet BM, Kurmann RJ. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors. Am J Surg Pathol 1999; 23: 617-635.

<sup>63</sup> Russell P. The pathological assessment of ovarian neoplasm. II: The proliferating epithelial tumors. Pathology 1979; 11: 251-282.

<sup>64</sup> Prayson RA, Hart WR, Petras RE. Pseudomyxoma Peritonii. A clinicopathologic study of 19 cases with emphasis on site of origin and nature of associated ovarian tumors. Am J Surg Pathol 1994; 18: 591-603.

<sup>65</sup> Ronnett BM, Kurman RJ, Zahn CM. Pseudomyxoma peritonii in women: A clinicopathologic analysis of 30 cases with emphasis on site of origin, prognosis, and relationship to ovarian mucinous tumors of low malignant potential. Hum Pathol 1995; 26: 509-524.

<sup>66</sup> Young RH, Gilks CB, Scully RE. Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonii: A clinicopathologic analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix. Am J Surg Pathol 1991;15: 415-429.

<sup>67</sup> Cuatrecasas M, Matias-Guiu X, Prat J. Synchronous mucinous tumors of the appendix and the ovary associated with pseudomyxoma peritonei: A clinicopathologic study of six cases with comparative analysis of c-fir-ras mutation. Am J Surg Pathol 1996; 20: 739-746.

<sup>68</sup> Ronnet BM, Szych C, Staebler A, Conolly D, Wu R, Cho KR. Molecular genetic evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonii (PMP) in women. Modern Pathol 1999; 123 (abstract).

<sup>69</sup> Nayar R, Siriaunkgul S, Robbins KM, McGowan L, Ginzan S, Siverberg SG. Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary. Hum Pathol 1996; 27:521-527.

<sup>70</sup> Hoerl HD, Hart WR. Primary ovarian mucinous Cystadenocarcinomas. A Clinicopathologic study of 49 cases with long-term follow-up. Am J Surg Pathol 1998;22:1449-1462.

<sup>71</sup> Lee KR, Scully RE. Mucinous tumors of the ovary. A clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type)

---

and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with "pseudomixoma peritonei". Am J Surg Pathol 2000; 24:1447-1464.

<sup>72</sup> Kline RC, Wharton JT, Atkinson EN, Burke TW, Gershenson DM, Edwards CL. Endometrioid carcinoma of the ovary: retrospective review of 145 cases. Gynecol Oncol 1990; 39: 337-346.

<sup>73</sup> Sampson JA. Endometrial carcinoma of the ovary. Arch Surg 1925; 10: 1-9.

<sup>74</sup> Bell DA, Scully RE. Atypical and borderline endometrioid adenofibromas of the ovary. A report of 27 cases. Am J Surg Pathol 1985; 9: 205-214.

<sup>75</sup> Snyder RR, Norris HJ, Tavassoli F. Endometrioid proliferative and low malignant potential tumors of the ovary. A clinicopathologic study of 46 cases. Am J Surg Pathol 1988;12: 661-671.

<sup>76</sup> Bell KA, Kurman RJ. A clinicopathologic analysis of atypical proliferative (borderline) tumors and well-differentiated endometrioid adenocarcinomas of the ovary. Am J Surg Pathol 2000; 24:1465-1479.

<sup>77</sup> Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ. World Health Organization histological classification of tumors. Histological typing of female genital tract tumours, 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994

<sup>78</sup> Russell P, Bannatyne P. Surgical pathology of the ovaries. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989.

<sup>79</sup> Zaino RJ, Unger ER, Whitney C. Synchronous carcinomas of the uterine corpus and ovary. Gynecol Oncol 1984;19:329-335.

<sup>80</sup> Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Bartos RE, Ferguson AW, Frank TS. Comparative analysis of histologic homologues of endometrial and ovarian carcinoma. Am J Surg Pathol 1998; 22: 319-326.

<sup>81</sup> Bell DA, Scully RE. Benign and borderline clear cell adenofibromas of the ovary. Cancer 1985; 56:2922-2931.

<sup>82</sup> Kennedy AW, Biscotti CV, Hart WR, Webster KD. Ovarian clear cell adenocarcinoma. Gynecol Oncol 1989;32: 342-349.

<sup>83</sup> O'Brien ME, Schofield JB, Tan S, Fryatt I, Fisher C, Wiltshaw E.

---

Clear cell epithelial ovarian cancer (mesonephroid): bad prognosis only in early stages. *Gynecol Oncol* 1993;49: 250-254.

<sup>84</sup> Sugiyama T, Kamura T, Junzo K, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary. A distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 2000; 88;2584-2589.

<sup>85</sup> Matias-Guiu X, Lerma E, Prat J. Clear Cell Tumors of the female genital tract. *Sem Diagn Pathol* 1997;14: 233-239.

<sup>86</sup> Behbakht K, Randall TC, Benjamin I, Morgan Ma, King S, Rubin SC. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 1998;70:255-258.

<sup>87</sup> Goff BA, Sainz de la Cuesta R, Muntz HG, Fleischhacker D, Ek M, Rice LW. Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol* 1996; 60:412-417.

<sup>88</sup> Depriest PD, Banks ER, Powell DE. Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women. *Gynecol Oncol* 1992;47: 71-75.

<sup>89</sup> Scott RB. Malignant changes in endometriosis. *Obstet Gynecol* 1953;2:283-289.

<sup>90</sup> Sainz de la Cuesta R, Eichhorn JH, Rice LW, Fuller AF, Nikrui N, Goff BA. Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 60:238-244.

<sup>91</sup> Scully RE. Recent Progress in ovarian cancer. *Hum Pathol* 1970;1: 73-79.

<sup>92</sup> Scully RE. Ovarian tumors: A review. *Am J Pathol* 1977; 87:686-720.

<sup>93</sup> Aure J, Hoeg K, Kolstad D. Clinical and histologic studies of ovarian carcinoma. Long-term follow-up of 990 cases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1971;50:63-67.

<sup>94</sup> Coll B, Lavertry C, Fortune D. Clear cell carcinoma of the ovary clinical and pathological features. *Obstet Gynecol* 1975;15:40-47.

<sup>95</sup> Leiman G. Carcinoma ex Endometriosis: The jury is still out. *Adv Anat Pathol* 1996;3:362-366.

- 
- <sup>96</sup> Vercellini P, Scarfone G, Bolis G, Stellato G, Carinelli S, Crosignani PG. Site of origin of epithelial ovarian cancer. The endometriosis connection. *Br J Obstet Gynaecol* 2000; 107:1155-1157.
- <sup>97</sup> LeGrenade A, Silverberg S. Ovarian tumors associated with atypical endometriosis. *Hum Pathol* 1988; 19:1080-1084.
- <sup>98</sup> Seidman JD. Prognostic importance of hyperplasia and atypia in endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:1-9.
- <sup>99</sup> Heaps J, Nieberg R, Berek J. Malignant neoplasm arising in endometriosis. *Obstet Gynecol* 1990;75:1023-1028.
- <sup>100</sup> Reimnitz C, Brand E, Nieberg R, Hacker N. Malignancy arising in endometriosis associated with unopposed estrogen replacement. *Obstet Gynecol* 1988;71:444-447.
- <sup>101</sup> Scully RE, Bell DA, Abu-Jawden GM. Update on early ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian tumors. En: Mason P, Sharp F, Blackett T, Berek J, eds. *Ovarian cancer, biological and therapeutic challenges*. London: Chapman and Hall, 1994 .p.139-144.
- <sup>102</sup> Mc Meekin DS, Burger RA, Manetta A, DiSaia P, Berman ML. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. *Gynecol Oncol* 1995; 59:81-86.
- <sup>103</sup> Hughesdon PE. Structure and origin of ovarian tumors. En: Kellar RJ eds. *Modern trends in gynaecology*, vol 3. Butterworths, London; 1973 .p.23-27.
- <sup>104</sup> Meyer R. Pathology of some special ovarian tumors and their relation to sex characteristics. *Am J Obstet Gynecol* 1931;22:697-703.
- <sup>105</sup> Schiller W. Mesonephroma ovarii. *Am J. Cancer* 1939;35:1-6.
- <sup>106</sup> Roth LM, Dallenbach-Hellweg G, Czernobilsky B. Ovarian Brenner tumors. I. Metastatic, proliferating and of low malignant potential. *Cancer* 1985; 56:582-591.
- <sup>107</sup> Kunze E, Schauer A, Schmitt M. Histology and histogenesis of two different types of inverted urothelial papillomas. *Cancer* 1983; 51:348-358.
- <sup>108</sup> Svenes KB, Eide J. Proliferative Brenner tumor or ovarian metastases? A case report. *Cancer* 1984; 53: 2692-2697.

- 
- <sup>109</sup> Kuhler R, Rao BR, Stolk JG, van Kessel H, Seldenrijk Ca, Willig AP. Estrogen synthesizing rare malignant Brenner tumor of the ovary with the presence of progesterone and androgen receptors in the absence of estrogen receptors. *Gynecol Oncol* 1987; 26: 263-269.
- <sup>110</sup> Creasman WT, Disaia PJ. Screening in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 7-12
- <sup>111</sup> Karlan BY, Raffel LJ. A multidisciplinary approach to the early detection of ovarian carcinoma: rational protocol design, and early result. *Am J Obstet. Gynecol* 1993; 50: 3-8.
- <sup>112</sup> Hata K, Hata T, Manabe A. A critical evaluation of transvaginal Doppler studies, transvaginal sonography, magnetic resonance imaging and Ca 125 in detecting ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 922-928
- <sup>113</sup> Bromley B, Goodman H, Benacerraf BR. Comparison between sonographic morphology and doppler waveform for the diagnosis of ovarian malignancy. *Obstet Gynecol* 1994; 83:434-437.
- <sup>114</sup> Schwartz PE. Utilidad de los marcadores tumorales en el diagnóstico preoperatorio de quistes de ovario. *Acta Gyn* 1993; 49:463-469.
- <sup>115</sup> Einhorn N, Sjövall K, Knapp RC. Prospective evaluation of serum Ca125 levels for early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 14-19.
- <sup>116</sup> JacobsIJ, Oram DH, Bast RC. Jr. Strategies for improving the specificity of screening for ovarian cancer with tumor-associated antigens Ca 125, Ca 15'3 and TAG 72,3. *Obstet Gynecol* 1992; 80:396-399.
- <sup>117</sup> Forstner R, Hricat H, Occhipinti K, Powell C, Frankel S, Stern J. Ovarian Cancer: staging with CT and MR imaging. *Radiology* 1995; 197:619-626.
- <sup>118</sup> Lawton F, Smith R. Surgery for gynecologic cancer. *Curr Opin Oncol* 1994; 6 : 80-85.
- <sup>119</sup> Granberg S, Wikland M, Janssom I. Macroscopic characterization of ovarian tumors and relation to the histologic diagnosis. Criteria to

---

be used for ultrasound evaluation. *Gynecol Oncol* 1989;35:139-144.

<sup>120</sup> Dietrich M, Osmer RG, Grobe G, Zech G, Suren A, Krauss T, Sander H, Fischer G. Limitation of the evaluation of adnexal masses by its macroscopic aspects, cytology and biopsy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;82:57-62.

<sup>121</sup> Khoo SK, Battistutta D, Huest T, Sanderson B, Ward BG, Free K. The prognostic value of clinical, pathologic and biologic parameters in ovarian cancer. *Cancer* 1993; 72:531-537.

<sup>122</sup> Swenerton KD, Hislop TG, Spinelli J, Leriche JC, yang N, Boyes A. Ovarian carcinoma: A multivariate analysis of prognostic factors. *Obstet Gynecol* 1985;65:264-270.

<sup>123</sup> Haapasalo H, Collan Y, Atkin NB. Major prognostic factors in ovarian carcinomas. *Int J Gynecol cancer* 1991;1: 155-162.

<sup>124</sup> Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin BU, Peñalver M, Steren A. National survey of ovarian carcinoma VI:Critical assesment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system. *Cancer* 1993;72:3007-3011.

<sup>125</sup> International Federation of Obstetrics and Gynecology. FIGO revised staging for ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 263-264.

<sup>126</sup> Yancik R. Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis and mortality. *Cancer* 1993;71:517-523.

<sup>127</sup> Markman M, Lewis JL Jr, Saigo P. Impact of age on survival of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;49: 236-239.

<sup>128</sup> Gloeckler LA. Ovarian cancer. Survival and treatment differences by age. *Cancer* 1993;71: 524-529.

<sup>129</sup> Shelley WE, Carmichael JC, Brown LB. Adryamicin and cis-platinum in the treatment of stage III and IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1988;29:208-221.

<sup>130</sup> Le T, Krepart GV, Lotocki RJ, Hewood MS. Does debulking surgery improve survival in biologically aggressive ovarian cancer? *Gynecol Oncol* 1997;67:208-214.

<sup>131</sup> Russell P. The pathological assesment of ovarian neoplasm. III.

---

The malignant epithelial tumors. *Pathol* 1979; 11:493-532.

<sup>132</sup> Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19 :7-15.

<sup>133</sup> Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Asumi K, Akiyama F, Silverberg SG. Towards the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998;70:2-12.

<sup>134</sup> Silva EG, Gershenson DM. Standardized Histologic Grading of epithelial ovarian cancer: Elusive after all these years. *Gynecol Oncol* 1998; 70:1-4.

<sup>135</sup> Malkassian GD, Melton LJ, O'Brien PC, Greene MH. Prognostic significance of histologic classification and grading of epithelial malignancies of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:274-284.

<sup>136</sup> Sorbe B, Frankeldan BO, Veress B. Importance of histologic grading in the prognosis of epithelial ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol* 1982;59:576-582.

<sup>137</sup> Baak JP, Wisse-Brekelmans EC, Langley FA, Talerman A, Delemarre JF. Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumours. *J Clin Pathol* 1986; 39:1340-1346.

<sup>138</sup> Ludescher C, Weger AR, Lindholm J. Prognostic significance of tumor cell morphometry, histopathology, and clinical parameters in advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1990; 9: 343-351.

<sup>139</sup> Geppert M, Smyczek-Gargya B. Morphologic criteria for the prognosis of serous cystadenocarcinomas of the ovary. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 39:136-140.

<sup>140</sup> Bichel P, Jacobsen A. A new histologic grading index in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1989; 8:145-155.

<sup>141</sup> Bell DA. Flow cytometry of ovarian neoplasm. In: Sasano N, ed. *Current topics in pathology. Gynecological tumors. Recent progress in diagnostic pathology.* Berlin: Springer-Verlag, 1992; 85:337-356.

<sup>142</sup> Gajweski WH, Fuller Jr AF, Pastel-Ley C, Flotte TJ, Bell DA. Prognostic significance of Dna content in Epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1994;6: 761-781.

<sup>143</sup> Tropé C, Kaern J. DNA ploidy in epithelial ovarian cancer: a new

---

independent prognosis factor? *Gynecol Oncol* 1994;53:1-4.

<sup>144</sup> Rice LW, Mark SD, Berkowitz RS, Goff BA, Lage JM. Clinicopathologic variables, operative characteristics and DNA ploidy in predicting outcome in ovarian epithelial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 379-385.

<sup>145</sup> Scully RE, Silva E. Pathology of ovarian cancer. En: Gershenson DM, McGuire WP, eds. *Controversies in the management of ovarian cancer*. New York: Churchill Livingstone; 1998 .p.425-444.

<sup>146</sup> Pejovic T. Genetic changes in ovarian cancer. *Ann Med* 1995;27:73-78.

<sup>147</sup> Leary JA, Doris CP, Boltz EM, Houghton CR, Kefford RF, Friedlander ML. Investigation of loss of heterozygosity at specific loci on chromosomes 3p, 6q, 11p, 17p and 17q in ovarian cancer. *Int J Gynecol cancer* 1994; 4:194-199.

<sup>148</sup> Scambia G, Benedetti-Pacini P, Ferrandina G. Epidermal growth factor, oestrogen and progesterone receptor expression in primary ovarian cancer: correlation with clinical outcome and response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1995; 72:361-366.

<sup>149</sup> Bast RC Jr., Jacobs I, Berchuck A. Malignant transformation of ovarian epithelium . *J Natl Cancer Inst* 1992;84:556-558

<sup>150</sup> Cho RC. Molecular Biology. In: Kurman, RJ. Ed., *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, New York, Springer-Verlag; 1994.p.1163-1198.

<sup>151</sup> King BL, Carcangiu ML, Carter D. Microsatellite instability in ovarian neoplasm. *Br J Cancer* 1995;72:376-382.

<sup>152</sup> Rubin SC, Benjamín I, Behbakht K. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *New Engl J Med* 1996;335:1413-1416.

<sup>153</sup> Isola J, Kallioniemi OP, Korte JM. Steroid receptors and Ki67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: correlation with DNA flow cytometry biochemical receptor assay, and patient survival. *J Pathol* 1990;162:295-301.

<sup>154</sup> NIH Consensus Conference. *Ovarian Cancer. Screening, treatment and*



---

follow-up. JAMA 1995;273:491-497.

<sup>155</sup> Nayar R, Siriaunkgul S, Robbins KM. Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary. Hum Pathol 1996;27:521-527.

<sup>156</sup> Bell DA, Scully RE. Ovarian serous borderline tumors with stromal microinvasion: A report of 21 cases. Hum Pathol 1990; 21:397-403.

<sup>157</sup> Chambers JT, Merino MJ, Kohorn EI, Schwartz PE. Borderline ovarian tumor. Am J Obstet Gynecol 1988; 159:1088-1094.

<sup>158</sup> Bell DA, Weinstock MA, Scully RE. Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors: Histologic features and prognosis. Cancer 1988; 62:2212-2222.

<sup>159</sup> Miyazaki T, Tomoda Y, Ohta M, Kano T, Mizuno K, Sakakibara K. Preservation of ovarian function and reproductive ability in patients with malignant ovarian tumor. Gynecol Oncol 1988;30:329-341.

<sup>160</sup> Finn CB, Luesly DM, Buxton EJ. Is stage I epithelial Ovarian cancer overtreated both surgically and Systemically? Result of a five year cancer registry review. Br J Obstet Gynecol 1992; 99:54-58.

<sup>161</sup> Griffiths CT. Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian cancer. Mongr Natl Cancer Inst 1975; 45:101-104.

<sup>162</sup> Le T, Krepert GV, Lotocki RJ, Hewood MS. Does debulking surgery improve survival in biologically aggressive ovarian cancer? Gynecol Oncol 1997; 67:208-214.

<sup>163</sup> Young RC, Walton LA, Ellenberg SS. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer: result of two prospective randomized trials. N. Engl. J. Med 1990; 322: 1021-1037

<sup>164</sup> Ashmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian cancer. J Clin Oncol 1996;14: 2968-2975.

<sup>165</sup> Piver MS, Malfetano J, Baker TR, Hempling RE. Five-year survival for stage IC or stage I grade 3 epithelial ovarian cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. Gynecol Oncol 1992; 46: 357-360

<sup>166</sup> Young RC, Brady MF, Nieberg RM. Randomized clinical trial of adjuvant treatment of women with early (FIGO I-IIA high risk) ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 1997; 7 (suppl 2): 17-23.

- 
- <sup>167</sup>Shelley WE, Carmichael JC, Brown LB. Adriamycin and Cis-platinum in the treatment of stage III and IV epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 1988;29:208-221.
- <sup>168</sup> Schwartz PE, Chamber JT, Kohorn EI, Chambers SK, Weitzman H, Voynick M, MacLusky N, Naftolin F. Tamoxifen in combination chemotherapy with cytotoxic chemotherapy in advance epithelial ovarian cancer: A prospective randomized trial. *Cancer* 1989; 63: 1074-1078.
- <sup>169</sup> Kaufman RJ. Management of advanced ovarian carcinoma. *Med Clin. North Am* 1966;50:845-846.
- <sup>170</sup> Omura Ga, Bundy BN, Berek JS, Curry S, Delgado G, Mortel R. Randomized trial of cyclophosphamide plus cisplatin with or without doxorubicin in ovarian carcinoma: A Gynecologic Group Study. *J Clin Oncol* 1989;7:457-465.
- <sup>171</sup> Swenerton K, Jeffrey J, Stuart G. Cisplatin-Cyclophosphamide versus carboplatin-cyclophosphamide in advance ovarian cancer: A randomized phase III study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trial Group. *J Clin Oncol* 1992;10: 718-726.
- <sup>172</sup> Hoskins PJ. Treatment of advance epithelial ovarian cancer: past, present and future. *Crit Rev Oncol/Hematol* 1995;20:41-59.
- <sup>173</sup> McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334:1-6.
- <sup>174</sup> McGuire WP, Ozols RF. Chemotherapy of advanced ovarian cancer. *Semin Oncol* 1998; 25:340-348.
- <sup>175</sup> Surwit E, Childers J, Atlas I. Neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol cancer* 1996;6:356-366.
- <sup>176</sup> Schwartz PE, Rutherford TJ, Chambers JT. Neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer: Long-term survival. *Gynecol Oncol* 1999;72: 93-99.
- <sup>177</sup> Howell SB, Zimm S, Markman M. Long-term survival of advanced refractory ovarian carcinoma patients with small-volume disease treated with intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 1987; 5:1607-1612.

- 
- <sup>178</sup> Alberts DS, Liu PY, Hanningan EV. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Eng J Med* 1996;335: 1950-1955.
- <sup>179</sup> Hird V, Maraveyas A, SenooK D. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. *Br J Cancer* 1993;68:403-406.
- <sup>180</sup> Pujade-lauraine E, Guastalla JP, Colombo N. Intraperitoneal recombinant interferon gamma in ovarian cancer patients with residual disease at second-look laparotomy. *J Clin Oncol* 1996; 14: 343-350.
- <sup>181</sup> Berek JS, Markman M, Stonebraker B. Intraperitoneal interferon alfa in residual ovarian carcinoma: A phase II Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1999;75:10-14.
- <sup>182</sup> Barnes MN, Pustilnik TB. Current Strategies in gene therapy for ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13:47-51
- <sup>183</sup> Tait DL, Obermiller PS, Holt JT. Preclinical studies of a new generation retroviral vector for ovarian cancer BRCA1 gene therapy *Gynecol Oncol* 2000;79:471-476.
- <sup>184</sup> Nagy HJ, Panis Y, Fabre M, Klatzmann D, Houssin D, Soubrane O. Suicide gene therapy of ovarian cancer: an experimental study in rats using retroviral-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Anticancer Res* 2000; 20:4633-4638.
- <sup>185</sup> Dorigo O, Berek JS. Gene therapy for ovarian cancer: development of novel tratment strategies. *Int J Gynecol Cancer* 1997;7: 1-13.
- <sup>186</sup> Collinet P, Lanvin D, Vreecque R, Quesnel B, Querleu D. Gene therapy and ovarian cancer:update of clinical trials. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2000;29:532-537.
- <sup>187</sup> Powell DE, Puls L, van Nagell JR. Current concepts in epithelial ovarian tumors: Does benign to malignant transformation occur? *Human Pathol* 1992;23:846-847.
- <sup>188</sup> Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodriguez GC, Whitaker BS, Bast RC. Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer* 1993;71:545-551.
- <sup>189</sup> Boyd J, RubinSC. Hereditary ovarian cancer:molecular genetics and

---

clinical implications. *Gynecol Oncol* 1997;64:196-206.

<sup>190</sup> Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of ErbB/HR signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 1999;32:25-29.

<sup>191</sup> Bast RC, Boyer CM, Jacobd I, Xu FJ, Wu S, Wiener J, Kohler M, Berchuck A. *Cancer* 1993; 71:1597-1601.

<sup>192</sup> Birindelli S, Aiello A, Lavarino C, sozzi G, Pilotti S, Pierotti MA. Genetic Markers in Sporadic Tumors. En Bronchud MH, Foote MA, Peters WP, Robinson MO, Eds: *Principles of Molecular Oncology*. Humana Press. New Jersey; 2000 .p. 45-93.

<sup>193</sup> Kacinski BM, Mayer AG, King BL, Carter D, Chamber SK: Neu protein overexpression in benign, borderline and malignant ovarian neoplasm: *Gynecol Oncol* 1992; 44: 245-253.

<sup>194</sup> Baker VV, Boest MP, Dixon D. C-myc amplification in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1990;38:340-342.

<sup>195</sup> Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchow Arch* 1998;433:103-111.

<sup>196</sup> Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors. A clinicopathological and molecular study of 95 cases. *Cancer* 1997; 79: 1581-1586.

<sup>197</sup> Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;68:820-823.

<sup>198</sup> Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:2979-2984.

<sup>199</sup> Myers MP, Stolarov JP, Eng C. PTEN, the tumor supresor from 10q23, is a dual-specific phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9052-9057.

<sup>200</sup> Bussaglia E, Del Rio E, Matias-Guiu X, Prat J. PTEN mutations in Endometrial Carcinoma: A molecular and Clinicopathologic Análisis of 38 cases. *Hum Pathol* 2000;31:312-317.

<sup>201</sup> Obata K, Morland SJ, Hitchcock A, Chevenix-Trench G, Thomas EJ, Campbell I. Frequent PTEN/MNAC mutations in endometrioid but not

---

serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998;58:2095-2097.

<sup>202</sup> Willert K, Nusse R. B-catenin: a key mediator of Wnt signalling. *Curr Op Gen Development* 1998;8:95-102.

<sup>203</sup> Kraus C, Liehr T, Hulsken J. Localization of the human  $\beta$ -Catenina gene to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 1994;23:272-274.

<sup>204</sup> Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. Beta catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with the EGF receptor. *J Cell Biol* 1994;127:1375-1380.

<sup>205</sup> Kanai Y, Ochiai A, Shibata T. The c-erbB2 gene product directly associates with  $\beta$ -Catenina and plakoglobin. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1995;208: 1067-1072.

<sup>206</sup> Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 1997; 275:1783-1790.

<sup>207</sup> Palacios J, Gamallo C. Mutations in the B-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 1344-1347.

<sup>208</sup> Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eiden D. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.

<sup>209</sup> Merajver SD, Pham TM, Caduff RF. Somatic mutations in BRCA 1 Gene in sporadic ovarian tumors. *Nature Genet* 1995;9:343-344.

<sup>210</sup> Takahashi H, Behbakht K, McGovern PE. Mutations analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers. *Cancer Res* 1996; 56:2998-3002.

<sup>211</sup> Takahashi H, Chiu HC, Bandera CA. Mutations of the BRCA2 gene in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:2738-2741.

<sup>212</sup> Foster KA, Harrington P, Kerr J. Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancers. *Cancer Res* 1996;56:3622-3625.

<sup>213</sup> Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K. Clinical and pathological features of ovarian cancers in women with germline mutations on BRCA 1. *N Engl J Med* 1996; 335: 1413-1416

- 
- <sup>214</sup> Eccles DM, Cranston G, Steel CM, Nakamura Y, Leonard RCF. Allele losses on chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene* 1990;5: 1599-1601.
- <sup>215</sup> Lee JH, Kavanagh JJ, Wildrick DM, Wharton JT, Blick M. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 6q, 11 and 17 in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1990;50:2724-2728.
- <sup>216</sup> Russell SE, Hickey GI, Lowry WS, White P, Atkinson RJ: Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene* 1990;5:1581-1583.
- <sup>217</sup> Sato T, Saito H, Morita R. Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:5118-5122.
- <sup>218</sup> Gallion HH, Powell DE, Morrow JK. Molecular genetic changes in human epithelial ovarian malignancies. *Gynecol Oncol* 1992;47:137-142.
- <sup>219</sup> Cliby W, Ritland S, Hartmann L. Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Res* 1990; 53:2393-2398.
- <sup>220</sup> Philips N, Ziegler M, Saha B, Xynos F. Allelic loss on chromosome 17 in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994;54:85-91.
- <sup>221</sup> Weitzel JN, Patel J, Smith DM. Molecular genetic changes associated with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1994; 55:245-252.
- <sup>222</sup> Pieretti M, Powell DE, Gallion HH. Genetic alterations on chromosome 17 distinguish different types of epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol* 1995;26:393-397.
- <sup>223</sup> Yang-Feng TL, Han H, Chen K-C. Allelic loss in ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1993;54:546-551.
- <sup>224</sup> Lu KH, Weitzel JN, Kodali S. A novel 4-cM minimally deleted region on chromosome 11p15.1 associated with high grade nonmucinous epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:387-390.
- <sup>225</sup> Gabra H, Taylor L, Cohen B. Chromosome 11 allele imbalance and clinicopathological correlates in ovarian tumors. *Br J Cancer* 1995;72:367-375.
- <sup>226</sup> Rodabaugh KJ, Biggs RB, Qureshi A. Detailed deletion mapping of chromosome 9p and p16 gene alterations in human borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 1995; 11: 1249-1254.
- <sup>227</sup> Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Nomura T, Shroyer KR.

---

Análisis of clonality by amplification of short tandem repeats. *Diagn Mol pathol* 1994;3:292-297.

<sup>228</sup> Wainscoat JS, Fey MF. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res* 1990;50:1355-1360.

<sup>229</sup> Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman JR. Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterocigosity, p53 mutation and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1793-1798.

<sup>230</sup> Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochia K, Takagi T, Nakamura Y. Identification by c-DNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; 60:5007-5011.

<sup>231</sup> Allen JI. Molecular biology of colon polyps and colon cancer. *Semin Surg Oncol* 1995;11:399-405.

<sup>232</sup> Lander ES. Array of hope. *Nature Genet* 1999; 21: 3-4.

<sup>233</sup> Southern E, Kalim M, Shchepino V. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genet* 1999; 21:5-9.

<sup>234</sup> Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC. Expression monitoring by hybridization to high-density DNA arrays: *Nature Biotech* 1996;14:1675-1680.

<sup>235</sup> Hacia JG, Brody LC, Chee MS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Gen* 1996; 14:441-447.

<sup>236</sup> Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 16-19.

<sup>237</sup> Kane AB. Redefining cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 1-2.

<sup>238</sup> Vaquero M. Apoptosis: ser o no ser, ésa es la cuestión. *Med Clin* 2000; 114:144-156.

<sup>239</sup> Flemming W. Uber die bildung von richtungsfiguren in saugethiereirn beim untergang graaf'scher folliklen. *Arch Anat Entwgsch* 1885:221-224.

<sup>240</sup> Graper L. Eine neue Anschauung uber physiologische Zellausschaltung. *Archive Zellforsch* 1914; 12:373-394.

<sup>241</sup> Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1951;26: 59-89

<sup>242</sup> Kerr JF, Wyllie AH, Curie AR. Apoptosis: abasic biological

---

Phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26:13-20

<sup>243</sup> Metzstein MM, stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. Trens Genet 1998; 14:410-416.

<sup>244</sup> Rösl F. A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. Nucleic Acid Research 1992;20:5243-5244.

<sup>245</sup> Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An overview of cell death. Am.J.Pathol. 1995; 146: 3-15.

<sup>246</sup> Verhaegen S. Microscopial study of cell deaths via apoptosis. Europ Microsp Anal 1998; 8:31-33.

<sup>247</sup> Cohen JJ. Overview : Mechanisms of apoptosis. Immunol. Today 1993; 14: 126-130.

<sup>248</sup> Ueda N, Shah SV. Apoptosis. J Lab Clin Med 1994; 124: 169-177.

<sup>249</sup> Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. Am J Surg Pathol. 1997; 21: 88-101.

<sup>250</sup> Barres B, Hart IK, Coles HSR. Cell death and control of cell survival in oligodendrocyte lineage. Cell 1992; 70: 31-46.

<sup>251</sup> Patel T, Gores GJ: Apoptosis and hepatobiliary disease. Hepatology 1995; 21: 1725-1741.

<sup>252</sup> Coles HSR, Burne JF, Ralff HC. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. Development 1993; 118: 777-784.

<sup>253</sup> Diaz-Cano SJ, Wolfe HJ. Apoptosis.De la morfología a los mecanismos. Patología 1995; 28: 255-257.

<sup>254</sup> Bowen ID, Bowen SM, Jones AH, eds. The genetic basis of programmed cell deaths. En: Mitosis and apoptosis. Matters of life and deaths. Chapman and Hall. London; 1998 .p. 60-69.

<sup>255</sup> Yang X, Chang H, Baltimore D. Essetial role of CED-4 Oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. Science 1998; 281:1355-1357.

<sup>256</sup> Hengartner MO. CED-4 is a stranger no more. Nature 1997; 388:714-



---

715.

<sup>257</sup> Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995 ; 267: 1445-1449.

<sup>258</sup> Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407: 796-801.

<sup>259</sup> Schwatzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrin Rev* 1993; 14: 133-151.

<sup>260</sup> Fukuhara S, Rowley JD, Varia Kojis D, Golomb HM. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res* 1979; 39:3119-3128.

<sup>261</sup> Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter KC, Mason DY. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Hematol* 1990; 76: 58-64.

<sup>262</sup> Craig RW. The bcl-2 gene family. *Semin Cancer Biol* 1995; 6 : 35-43.

<sup>263</sup> Chen-Levy Z, Nourse J, Cleary ML. The bcl-2 candidate is a 24 kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t (14;18) translocation. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 701-710.

<sup>264</sup> Chetty R, Dada MA, Gatter K. Bcl-2: Longevity Personified! *Adv Anat Pathol* 1997;4: 134-138.

<sup>265</sup> De Jong D, Prins F, Mason DY, Reed JC, Van Ommen GB, Kluin PM. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 1994; 54:256-260.

<sup>266</sup> LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissue suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993; 142: 743-753.

<sup>267</sup> Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein for histopathologist? *Histopathology* 1995; 26: 89-93.

<sup>268</sup> Yuan J, Yanker BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407: 802-809.

- 
- <sup>269</sup> Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1976;119: 159-166.
- <sup>270</sup> Tilly JL, Kowlasky KI, Johnson AL . Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799-2801.
- <sup>271</sup> Hockenberry D, Nuñez G, Milliman C. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-386.
- <sup>272</sup> Hawkins C. The role of Bcl-2 in the programmed cell death. *Immunol Rev* 1994; 142: 127-139.
- <sup>273</sup> Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- <sup>274</sup> Reed JC. Double identity for protein of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 387: 773-776.
- <sup>275</sup> McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D. Solution structures of the proapoptotic molecule Bid: a structural basis for apoptosis agonist and antagonist. *Cell* 1999; 96: 625-634.
- <sup>276</sup> Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256: 50-57.
- <sup>277</sup> Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang H-g, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. *Am J Pathol* 1994; 145:1323-1333.
- <sup>278</sup> Zhan Q, Fan S, Bae I, Gullouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Induction of Bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; 9: 3743-3751.
- <sup>279</sup> Oltva ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79: 189-192.
- <sup>280</sup> Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 245-267
- <sup>281</sup> Putcha GV, Deshmukh M, Johnson EM Jr. Bax translocation is a critical event in neural apoptosis: regulation by neuroprotectans, bcl-2 and caspases. *J Neurosci* 1999;7: 7476-7485.

- 
- <sup>282</sup> Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Núñez G, Thompson CB. Bcl-X, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell deaths. *Cell* 1993; 74:609-619.
- <sup>283</sup> Chittenden T, Harrington EA, O'Connors R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC. Induction apoptosis by the bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 733-736.
- <sup>284</sup> Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues: differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggest a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 1995; 146: 1309-1319.
- <sup>285</sup> Craig RW. The bcl-2 gene family. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 35-43.
- <sup>286</sup> Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Gene Cells* 1998; 3: 697-707.
- <sup>287</sup> Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997; 385:637-640.
- <sup>288</sup> Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 1899-1911.
- <sup>289</sup> Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-487.
- <sup>290</sup> Amati B, Littlewood TD, Evans GI, Land H. The c-myc protein induces cell cycles progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO* 1993; 12: 5083-5087.
- <sup>291</sup> Bissonnette RP, Echevarri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell deaths induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
- <sup>292</sup> Vaux DL, Weissman IL. Neither macromolecular synthesis nor myc is required for cell death via the mechanism that can be controlled by bcl-2. *Mol Cell Biol* 1993; 13 : 7000-7005.
- <sup>293</sup> Harrington EA, Bennet MR, Fanidi A, Evans GI. C-myc induced

---

apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytoquines. EMBO 1994; 13:3286-3295.

<sup>294</sup> Lane D. P53: Guardian of the genome. Nature 1992; 358: 15-16.

<sup>295</sup> Tan Th, Wallis J, levine AJ. Identification of thr p53 protein domain involved in the formation of the SV40 large antigen protein complex. J virol 1986; 659:574-583.

<sup>296</sup> Batsakis JG, El-Naggar AK. P53. Fifteen years after discovery. Adv Anat Pathol 1995; 2: 71-88.

<sup>297</sup> Darnton SJ. P53. J Clin Pathol: Mol Pathol 1998; 51:248-253.

<sup>298</sup> Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A. Identification of p53 as a sequence specific DNA binding protein. Science 1991;252:1708-1711.

<sup>299</sup> Milner J. Forms and Functions of p53. Semin Cancer Biol 1994; 5: 211-219.

<sup>300</sup> Marchenko ND, Zaika A, Mols UM. Death Signan-induced localization of p53 protein to mitochondria. J Biol Chem 2000; 275: 16202-16212.

<sup>301</sup> Jayaraman L, Prives C. Activation of sequence specific DNA binding by short single strands of DNA require of p53 c-terminus. Cell 1995; 81:1021-1029.

<sup>302</sup> Prives C, Hall P. The p53 pathway. J Pathol 1999; 187:112-126.

<sup>303</sup> Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. Cell 1992; 70:523-526.

<sup>304</sup> Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor supresor p53. FEBS Lett 1997;420: 25-27.

<sup>305</sup> Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. MDM2 promotes the rapid degradation of p53. Nature 1997; 387: 296-299.

<sup>306</sup> Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-MDM2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev 1993; 7: 1126-1132.

<sup>307</sup> Kubbutat MGH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by MDM2. Nature 1997; 387:296-299.

<sup>308</sup> Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature 2000; 408: 307-310.

<sup>309</sup> Moll U, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, Zambetti G. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protain impairs the G1

---

checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1126-1137.

<sup>310</sup> Hansen R, Oren M. P53: from inductive signal to cellular effect. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7 :46-51.

<sup>311</sup> Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem* 1998; 273: 1-4.

<sup>312</sup> Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol* 1997;183: 134-140.

<sup>313</sup> Wang XW. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc.Natl. acad.Sci. USA* 1999;96: 3706-3711.

<sup>314</sup> Wyllie A. Clues in the p53 murder mystery. *Nature* 1997; 389: 237-238.

<sup>315</sup> Evan G, Littlewood T. A matter of Life and cell death. *Science* 1998; 281:1317-1321.

<sup>316</sup> Oren M. Relationship of p53 to the control of apoptotic cell deaths. *Semin Cancer Biol* 1994;5:221-227.

<sup>317</sup> Oda K, Avakawa H, tanaka T, Matsuda K, Tanikana C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. P53AIP1, a potential mediator of p53 dependent apoptosis and its regulation by ser 46 phosphorylated p53. *Cell* 2000; 849-862.

<sup>318</sup> Lin Y, Ma W, Benchmol S. PIID a new death domain containing protain is induced by 53 and promotes apoptosis. *Nature Genet* 2000;26:122-127.

<sup>319</sup> Wahl GM, Linke SD, pawlson TG, Huang LC. Maintaining genetic stability through Tp53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv* 1997; 29: 189-219.

<sup>320</sup> Lozano G, Elledge SJ. Cancer:p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature* 2000;404:24-25.

<sup>321</sup> Tanaka H. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000; 404: 42-45.

<sup>322</sup> Hendrix MJ. De-mystifying the mechanism of maspin. *Nature Med* 2000; 6: 374-376.

- 
- <sup>323</sup> Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. P53 mutations in human cancer. *Science* 1991;253: 49-53.
- <sup>324</sup> Milner J, Metcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991;65:765-774.
- <sup>325</sup> Ahuja HG, Testa MP, Cline MJ. Variation in the protein coding region of the human p53. *Oncogene* 1990; 5: 1409-1410.
- <sup>326</sup> Ziegler A, Jonanson AS, Leffell DJ. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994; 372: 773-776.
- <sup>327</sup> Levine AJ, Perry ME, Chang A. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69:409-416.
- <sup>328</sup> Midgley CA, Lane DP. P53 protein instability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on MDM2 binding. *Oncogene* 1997;15:1179-1189.
- <sup>329</sup> Ohki R, Nemoto J, Murama H, Oda E. Reprimo a new candidate mediator of the p53 mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem* 2000; 275: 22627-22630.
- <sup>330</sup> Soini Y, Pääkko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 1998; 153: 1041-1049.
- <sup>331</sup> Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355-365.
- <sup>332</sup> Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1309.
- <sup>333</sup> Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795
- <sup>334</sup> Green DR. Apoptotic pathways: the roads to win. *Cell* 1998;94:695-698.
- <sup>335</sup> Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptor. *Pharm Acta Helv* 2000;74: 281-286.
- <sup>336</sup> Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo 2 ligand. *Recet Prog Horm Res* 1999; 54: 225-234.
- <sup>337</sup> Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;

---

281:1309-1312.

<sup>338</sup> Hengartner MO. Death cycle and Swiss army knives. *Nature* 1998; 391:441-442.

<sup>339</sup> Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; 256: 19-26.

<sup>340</sup> Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunt scissors. *Cell* 2000; 102: 1-4.

<sup>341</sup> Martilou JC. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999; 397: 479-480.

<sup>342</sup> Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-478.

<sup>343</sup> Ruoslahti E, Reed J. New Way to activate caspasas. *Nature* 1999;397: 479-480.

<sup>344</sup> Kauffman SH. Activation of cell death pathways. *Hematology* 1999; 3: 476-482.

<sup>345</sup> Grunville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; 72:893-913.

<sup>346</sup> Basu S, Kolennick R. Stress signals for apoptosis:ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 1998; 17:3277-3285.

<sup>347</sup> Stewart BW: Mechanism of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J. Natl Cancer Inst.* 1994; 86:1286-1296.

<sup>348</sup> Hengartner M. Death by crowd control. *Science* 1998; 281: 1298-1299.

<sup>349</sup> Thornberry NA, Lazeburk J. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316.

<sup>350</sup> Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohora N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998;17:3237-3245.

<sup>351</sup> Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.

<sup>352</sup> Enari M, Sakahira H, Yokoyama H. A caspase actived Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;

---

391:43-50.

<sup>353</sup> Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis. The role of endonuclease. *Am. J. Pathol* 1990; 136: 593-608.

<sup>354</sup> Boswan FJ, Vissner BC, Deveren J. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996; 192: 676-683.

<sup>355</sup> Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391:96-99.

<sup>356</sup> Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996; 135: 1441-1445.

<sup>357</sup> Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K. Caspase 3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis. *Science* 1997; 278: 294-298.

<sup>358</sup> Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK 2. *Science* 1997, 276:1571-1574.

<sup>359</sup> Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407: 784-788.

<sup>360</sup> Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognising death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trend Cell Biol* 1998; 8: 365-372.

<sup>361</sup> Marguet D, Luciani MF, Moynault A, Williamson P, Chimini G. Elongation of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nature Cell Biol* 1999; 1: 454-456.

<sup>362</sup> Scheneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptor. *Pharm Acta Helv* 2000; 74: 281-286.

<sup>363</sup> Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Linz MZ, Juo P, Hu LS. Akt promotes cell survival by phosphoryating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-868.

<sup>364</sup> Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 3261-3270.

<sup>365</sup> Green DR. A myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* 1997; 278: 1246-1247.



- 
- <sup>366</sup> Green DR. Death deceiver. *Nature* 1998; 396:629-630.
- <sup>367</sup> Mayo HW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, Der CJ. Requirement of NF- $\kappa$ B activation suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenetic Ras. *Science* 1997; 278: 1812-1825.
- <sup>368</sup> Schwartz SM. Cell death and the caspase cascade. *Circulation* 1998; 97: 227-229.
- <sup>369</sup> La Casse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackesie AE. The inhibition of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259.
- <sup>370</sup> Earnshaw WC. A cellular poison cupboard. *Nature* 1999; 397: 387-389.
- <sup>371</sup> Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuang J, Wagner G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 1999; 7: 615-624.
- <sup>372</sup> Duke RC, Ojcius DM, Young JDE. Cell suicide in Health and Disease. *Scientific American* 1996; 82: 80-87.
- <sup>373</sup> Arends MJ. Apoptosis in the endometrium. *Histopathology* 1999; 35;174-178.
- <sup>374</sup> Thomas JP, Dorflinger LJ, Behrmar HR. Mechanism of the rapid antigonadotropin action of prostaglandins in cultured luteal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75: 1344-1348.
- <sup>375</sup> Strange R, Li F, Saurer S . Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; 115: 49-58.
- <sup>376</sup> Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Met Rev* 1992; 11: 179-195.
- <sup>377</sup> Schmid Ds, Tite JP, Ruddle NH. DNA fragmentation: Manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T- Cell lines, Lymphotoxin- secreting helper T-cell clones and cell-free lymphotoxin- containing supernatant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1881-1885.
- <sup>378</sup> Mccarthy NJ, Smith C, Williams GT. Apoptosis in the development of

---

the immune system: growth factors, clonal selection and bcl-2. *Cancer and metastasis reviews* 1992; 11:157-178.

<sup>379</sup> Columbano A, Ledda- Columbano GM, Rajalakshmi S, Sarma DSR. Occurrence of cell death in preneoplastic and neoplastic liver cells. A sequential study. *Am J Pathol* 1984; 116: 441-446.

<sup>380</sup> Kerr JFR, Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration- induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch* 1973; 13: 87-102.

<sup>381</sup> Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.

<sup>382</sup> Oates PS, Morgan RG, Light AM. Cell death during pancreatic involution after raw soya flour feeding in rat. *Am J Physiol* 1986; 250: 9-14.

<sup>383</sup> Ledda GM, Columbano A, Coni P . Cell deletion by apoptosis during regression of renal hyperplasia. *Am J Pathol* 1989; 135: 657-662.

<sup>384</sup> Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.

<sup>385</sup> Wyllie AH, Rose KA, Morris RG . Rodent fibroblast tumour expressing human myc and ras gene: growth, metastasis and endogenous oncogen overexpression. *Br J Cancer* 1987; 56: 251-259.

<sup>386</sup> Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell number in normal and neoplastic tissue: an overview. *Cancer and metastasis reviews* 1992; 11: 95- 103.

<sup>387</sup> Dederda DA, Waller EK, Lebrun Dp . Chimeric homeobox gene E2A-PBX 1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. *Cell* 1993; 74: 777-779.

<sup>388</sup> Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.

<sup>389</sup> Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;279:300-307.

<sup>390</sup> Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis. Basic concepts and potential significance on human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:310-319.

<sup>391</sup> Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in

---

cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.

<sup>392</sup> Bursch W, Lauer B, Timmerman I, Barther G . Controlled death of normal and putative preneoplastic cell in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 1984; 5: 453-458.

<sup>393</sup> Schulte- Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grassi B. Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis. *Toxicol Lett* 1992; 64: 569-574.

<sup>394</sup> Carson RA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341:1251-1254.

<sup>395</sup> Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment disease. *Science* 1995;267: 1456-1462.

<sup>396</sup> Sarraf LE, Bowen ID. Proportions of mitotic and apoptotic cells in range of untreated experimental tumours. *Cell tissue kinetics* 1988; 21: 45-49.

<sup>397</sup> Wyllie AH. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res* 1985; 5: 131-136.

<sup>398</sup> Staunton MJ, Gaffney EF. Tumor Type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am J Clin Pathol* 1995; 103:300-307.

<sup>399</sup> William GT, Smit CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic control of cell death. *Cell* 1993; 74: 777-779.

<sup>400</sup> Kerr JFR, Searle J, Harmon HV, Bishop BV. Apoptosis. In: Potten, CS, ed. *Perspectives on Mammalian cell death*. Oxford: Oxford University Press; 1987 .p.93-128.

<sup>401</sup> Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on cell death. *Cell* 1994; 76:777-779

<sup>402</sup> Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell number in normal and neoplastic tissue: An overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 95-103.

<sup>403</sup> Wyllie AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 1997; 73:189-197

<sup>404</sup> Jager R, Herzer U, Schenkel J, Heiner H. Overexpression of bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice.

---

Oncogene 1997; 15: 1787-1795.

<sup>405</sup> De Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluin PM. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 1994;54: 256-260.

<sup>406</sup> Harris DR, Vavill J. Apoptosis and the prostate. *Br J Urol* 1995;75:27-33.

<sup>407</sup> Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Op Oncol* 1995; 7:541-546.

<sup>408</sup> Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;385:637-640.

<sup>409</sup> Lowe SW, Lin AW. Apoptosin in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-495.

<sup>410</sup> Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasnious V, Niskanen E, Reed JC. Reduced expression of pro-apoptotic gene bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 25: 35-41.

<sup>411</sup> Sarkiss M, Hsu B, El-Naggar AK, McDonnell TJ. The clinical relevance and assesment of apoptotic cell death. *Adv Anat Pathol* 1996; 4:205-211.

<sup>412</sup> Wallace-Brodeur RR, Lowe S. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:64-75.

<sup>413</sup> Hainaut P, Hernández T, Robinson A. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisations tools. *Nucleic Acids Res* 1998;26:205-213.

<sup>414</sup> Kushner J, Bradley G, Jordan RCK. Altered p53 expression is probably an early event in oral carcinogenesis. *J Pathol* 1997; 183:418-423.

<sup>415</sup> Low EO, Gibbins JR, Walker DM. In situ detection of specific p53 mutations in cultured cells using the amplification refractory mutation system polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 2000;

---

9:210-220.

<sup>416</sup> Hayes VM, Bleeker W, Verlind E, Timmer T, Karrenbeld A, Plukker JT, Marx MP, Hofstra RM, Buys CH. Comprehensive TP53- Denaturing gradient gel electrophoresis mutation detection assay also applicable to archival paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8:1-10.

<sup>417</sup> Logullo AF, Pereira de Moura R, Nonogaki S, Kowalski LP, Nagai MA, Simpson AJ. A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9: 35-40.

<sup>418</sup> Hickman JA. Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer* 1996;6: 921-926.

<sup>419</sup> Lowe SW, Ruley HE, Jacks T . P53- dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.

<sup>420</sup> Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999; 187: 122-137.

<sup>421</sup> Levine A. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331

<sup>422</sup> Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

<sup>423</sup> O'Connell M, Walworth N, Carr A. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 296-303.

<sup>424</sup> Zhou BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000 ;408: 433-439.

<sup>425</sup> Lavin M, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 177-202.

<sup>426</sup> Bell D, Varley J, Szydlo T, Kang D, Wahrer D, Shannon K, Lubratovich M, Verselis S, Isselbacher K, Fraumeni J, Birch J, Li F, Garbe RJ, Haber D. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528-2531.

<sup>427</sup> Bao S, Chang M, Auclair D, Sun Y, Wang Y, Wong W, Zhang J, Liu Y, Qian X, Sutherland R, Magi-Galluzzi C, Weisberg E, Cheng E, Hao L, Sasaki H, Campbell M, Kraeft S, Loda M, Lo K, Chen L. HRad17, a human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint gene rad17, is

---

overexpressed in colon carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 2023-2028.

<sup>428</sup> Von Deimling F, Scharf J, Liehr T, Rothe M, Kelter A, Albers P, Dietrich W, Kunkel L, Wernert B, Wirth B. Human and mouse RAD17 genes: identification, localization, genomic structure and histological expression pattern in normal testis and seminoma. *Hum Genet* 1999; 105: 17-27.

<sup>429</sup> Cahill D, Lengua RC, Yu J, Riggins G, Willson J, Markowitz S, Kinzler K, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392: 300-303.

<sup>430</sup> Scolnick D, Halazonetis T. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 2000; 406: 430-435.

<sup>431</sup> Komatsu K, Miyashita T, Hang H, Hopkins KM, Zheng Wei, Cuddeback S, Yamada M, Lieberman HB, Wang HG. Human homologue of *S pombe* Rad9 interacts with bcl-2/bcl-x<sub>1</sub> and promotes apoptosis. *Nature Cell Biol* 2000; 2:1-6.

<sup>432</sup> Volkmer E, Kamits LM. Human Homologs of *S Pombe* rad 1, hus 1 and rad 9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 567-570.

<sup>433</sup> May PA, Going JJ. Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology* 1999; 35: 489-494.

<sup>434</sup> Delgado-Rodriguez M. Sesgos en el estudio de los factores pronósticos. *Med Clin* 1999; 112: 51-58.

<sup>435</sup> Harrison DJ. Counting apoptosis- why and how? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49: 245-246.

<sup>436</sup> Van de Schepop HAM, de Jong JS, Van Diest PJ, Baak JP. Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive breast cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996;49: 214-217

<sup>437</sup> Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H, Lassmann H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: Application of In situ nick Translation to cell cultures systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1023-1030.

<sup>438</sup> Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De Velde CJH, Cornelise CJ,

---

Van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ End-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:7-12

<sup>439</sup> Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993; 170:1-8.

<sup>440</sup> Panizo A, Vega F. Estudio de la apoptosis mediante TUNEL. *Rev Esp Patol* 1997;30;243-244.

<sup>441</sup> Selva DM, Tirado OM, Torán N, Suárez-Quian CA, Reventos J, Munell F. Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 2000;141:1168-1177.

<sup>442</sup> Stähelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J. False positive staining in the T.U.N.E.L. assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51:204-208.

<sup>443</sup> Sloop GD, Roa JC, Delgado AG, Balart JT, Hines III M, Hill JM. Histologic sectioning produces TUNEL Reactivity. A potential cause of false-positive staining. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 529-532.

<sup>444</sup> Kiyozuka Y, Akamatsu T, Singh A, Ichiyoshi T, Senzaki H, Tsubura A. Optimal prefixation of cells to demonstrate apoptosis by the TUNEL Method. *Acta Cytol* 1999; 43: 393-399.

<sup>445</sup> Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999;27:e12 (i-iii)

<sup>446</sup> Kirwood BR, ed. *Essential of Medical Statistics*. Blackwell Science Ltd. Oxford; 2000.

<sup>447</sup> Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.

<sup>448</sup> Peto R. Asymptomatically efficient rank invariant procedures (with discusión). *J R Statist Soc* 1972; 135 (A): 185-207.

<sup>449</sup> Cox DR. Regresión Model and life tables (with discusión). *J R Statist Soc* 1972; 34 (A): 187-220.

<sup>450</sup> Pajak T, Clark GH, Sargent DJ, McShane LH, Hammon EH. Statistical

---

Issues in tumor marker studies. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 1011-1015.

<sup>451</sup> Cardon LR, Bell JI. Association study design for complex disease. Nature Genet 2001; 3:91-99.

<sup>452</sup> Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. Am J Pathol 2000; 156:409-417.

<sup>453</sup> Halm U, Tannapfel A, Breituntg B, Breidert M, Wittekind CW, Mossner J. Apoptosis and cell proliferation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence of Barret's esophagus. Hepatogastroenterology 2000; 47:962-966.

<sup>454</sup> Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. BMJ 2001; 322: 1538-1539.

<sup>455</sup> Darai E, Walker- Combrouze F, Mlika-Cabanne N, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY. Expression of p53 protein in borderline epithelial ovarian tumors: a clinicopathologic study of 39 cases. Eur J Gynaecol Oncol 1998; 19: 144-149.

<sup>456</sup> Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstain B. P53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as a late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1990;50: 7717-7722.

<sup>457</sup> Ioffe O, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2, c-erb-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. Hum Pathol 1998; 29:1150-1159.

<sup>458</sup> Witty JP, Jensen RA, Johnson AL. Expression and localization of Bcl-2 related protein in human ovarian cancers. Anticancer Res 1998; 18:1223-1230.

<sup>459</sup> Wehrli BM, Krajewski S, Gascoyne RD, Reed JC, Gilks CB. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, mcl-1, and bcl-x expression in ovarian surface epithelial tumors. Int J Gynecol Pathol 1998;17:255-260.



- 
- <sup>460</sup> Marone M, Scambia G, Mozzeti S, Ferrandina G, Iacovella S, De Pasqua A, Benedetti-Pacini P, Mancuso S. Bcl-2, bax, bclxl y bclxs expresión in normal and neoplastic ovarian tisúes. Clin Cancer Res 1998;4:517-524.
- <sup>461</sup> Soini Y, Pääkkö P. Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. Hum Pathol 1996; 27:1221-1226.
- <sup>462</sup> Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmitd M, Lohrs U. Bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinoma. Am J Clin Pathol 1996; 105: 341-349.
- <sup>463</sup> Bosarii S, Viale G, Radealli U. P53 accumulation in ovarian carcinomas and its prognosis implications. Hum Pathol. 1993; 24: 1175-1179.
- <sup>464</sup> Sohn JH, Kim DH, Choi NG, Park YE, Ro JY. Caspase-3/ CPP32 immunoreactivity and its correlation with frequency of apoptotic bodies in human prostatic carcinomas and benign nodular hiperplasias. Histopathology 2000; 37: 555-560.
- <sup>465</sup> Schwandner O, Schiedeck HK, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R. Apoptosis in rectal cancer. Prognostic significance in comparison with clinical, histopathologic, and immunohistochemical variables. Dis Colon Rectum 2000; 43:1227-1236.
- <sup>466</sup> Klime PJ, Pylkkanen L, Kiilholma. P53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. Cancer 1995; 76:1201-1207.
- <sup>467</sup> Geisler JP, Geisler HE, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z, Crabtree W. p53 and bcl-2 in epithelial ovarian carcinoma: their value as prognostic indicators at a median follow-up of 60 months. Gynecol Oncol 2000; 77:278-282.
- <sup>468</sup> Mc Menamin ME, O'Neill AJ, Gaffney EF. Extent of apoptosis in ovarian serous carcinoma: relation to mitotic and proliferative indices, p53 expression and survival. J Clin Pathol:Mol Pathol 1997; 50:242-246.
- <sup>469</sup> Yamasaki F, Tokunama O, Sugimori H. Apoptotic index in ovarian carcinoma: Correlation with clinicopathologic factors and prognosis.

---

Gynecol Oncol 1997;66: 439-448.

<sup>470</sup> Herod JJ, Eliopolus AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. Cancer Res 1996; 56: 2178-2184.

<sup>471</sup> Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1995; 55:237-241.

<sup>472</sup> Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG. The bcl-2 protein: A prognosis indicator strongly related to p53 protein in lymph node negative breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 1994; 86 :499-504.

<sup>473</sup> Ozawa A, Konishi F, Fukayama M, Kanazawa K. Apoptosis and its regulation in flat type early colorectal carcinoma. Dis Colon Rectum 2000; 43:23-28.

<sup>474</sup> Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis , bax, bcl-2 and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. Cancer 1999; 86:913-920.

<sup>475</sup> Lipponen Pk, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. Eur J Cancer 1994; 30:2068-2073.

<sup>476</sup> Aihara M, Scardino PT, Truong LD, Wheeler TM, Goad JR, yang G, Thompson TC. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. Cancer 1995; 75: 522-529.

<sup>477</sup> Lipponen Pk, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factor and prognosis. J Pathol 1994;173: 333-339.

<sup>478</sup> Korkolopoulo P, Konstantinidou A, Christodoulou P, Patsouris E, Thomas-Tsangli E, Kapralos P, Davaris P. Apoptosis in bladder carcinomas detected with monoclonal antibody to single-stranded DNA: Relation to cell cycle regulators and survival. Urology 2000; 56: 516-520.

<sup>479</sup> Evan GI, Littlewood TD. The role of c-myc in cell growth. Curr Opin Genet Dev 1993; 3: 44-49.

- 
- <sup>480</sup> Stewart BM. Mechanism of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1286-1296.
- <sup>481</sup> Brook FB, Raafat F, Eldeeb BB, Mann JR. Histologic and immunohistochemical investigation of neuroblastomas and correlation with prognosis. *Human Pathol* 1988;19:879-888
- <sup>482</sup> Shanin MS, Hughes JH, Sood AK, Buller RE. The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma. *Cancer* 2000; 89:2006-17.
- <sup>483</sup> Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R. P53 gene mutations and proteina accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 4961-4965.
- <sup>484</sup> Ausperg N, Edelson MI, Mok SC. The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1998;25:281-304.
- <sup>485</sup> Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expresión and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *Brit J Cancer* 1995; 6: 1324-1329.
- <sup>486</sup> Lohman CM, League AA, Claks WS, Lawson D, DeRose PB, Cohen C. Bcl-2:bax and bcl-2 :bcl-x ratios by image cytometric quantitation of immunohistochemical expression in ovarian carcinomas: correlation with prognosis. *Cytometry* 2000; 42:61-66.
- <sup>487</sup> Piris MA, Pezzella F, Martinez Montero JC. P53 and bcl-2 expression in high grade B cell Lymphomas: Correlation with survival times. *Br J Cancer* 1994;69:337-341.
- <sup>488</sup> Pilotti S, Collini P, Del Bo R. A novel panel of antibodies that segregates immunocitochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcioma of the thyroid glans. *Am J surg Pathol* 1994;172:337-342.
- <sup>489</sup> Pezzella F, Turley H, Kuzu I. Bcl-2 protein in non small cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-694.
- <sup>490</sup> Lu QL, Abel P, Foster C. Bcl-2: Role in Epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996; 27: 102-110.
- <sup>491</sup> Pietenpol JA, Papadoupolus N, Markowitz S, Wilson JK, Kinnzler KW,

---

Vogelstein. Paradoxical inhibition of solid cell growth by bcl-2. *Cancer Res* 1994;54: 3714-3717.

<sup>492</sup> Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS, Rodriguez G, Berchuck A. Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 1007-1010.

<sup>493</sup> Kaye B. Ovarian Cancer, from the laboratory to the clinic: Challenges for the future. *Ann Oncol* 1996; 7:9-13.

<sup>494</sup> Wheeler JA, Stephen LC, Tornos C, Eifel PJ, Ang KK, Milas L, Allen PK, Meyn RE. Apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage Ib cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32: 1847-1493.

<sup>495</sup> Reed JC: Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9: 451-474.

<sup>496</sup> Perego P, Giarola M, Rigueti S, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti M, Miyashita T, Reed J, Zunino F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res* 1996; 56:556-562.

<sup>497</sup> Xiang J, Gomez-Navarro J, Arafat W, Liu B, Barker SD, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT. Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding Bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer. *J Gene Med* 2000; 2: 97-106.

<sup>498</sup> Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, Kita T, Hirata J, Tode T, Ishii K, Nagata I. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1214-1219.

<sup>499</sup> Caspari T, Dahlen M, Kanter-Smoler G, Lindsay H, Hofmann K, Papadimitriou K, Sunnerhagen P, Carr A. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* hus1: a PCNA-related protein that associates with rad1 and rad9. *Mol Cell Biol* 2000;20: 1254-1262.

<sup>500</sup> Weiss RS, Enoch T, Leder P. Inactivation of mouse Hus-1 results in genomic instability and impaired responses to genotoxic stress. *Genes Dev* 2000; 15:1886-1898.