



MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO,
PROGESTERONA, ANDRÓGENO E HER2 NO
CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO**

***EXPRESSION OF ESTROGEN, PROGESTERONE,
ANDROGEN AND HER2 RECEPTORS IN THE
EPITHELIAL OVARIAN CANCER***

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO,
PROGESTERONA, ANDRÓGENO E HER2 NO
CÂNCER EPITELIAL DE OVÁRIO**

Orientador: Prof. Dr. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. M. DERCHAIN

***EXPRESSION OF ESTROGEN, PROGESTERONE,
ANDROGEN AND HER2 RECEPTORS IN THE
EPITHELIAL OVARIAN CANCER***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração em Oncologia Ginecológica e Mamária.

Dissertation submitted to the Programme of Obstetrics and Gynecology of the Unicamp's Faculdade de Ciências Médicas for obtaining the title of *Master in Health Sciences in the concentration area of Gynecologic Oncology and Mammary.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO
E ORIENTADA PELO PROF. DR. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

Assinatura do Orientador

Campinas, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

T575e	Toledo, Maria Carolina Szymanski, 1982- Expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, andrógeno e HER2 no câncer epitelial de ovário / Maria Carolina Szymanski de Toledo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012. Orientador: Luis Otávio Zanatta Sarian. Coorientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Imunoistoquímica. 2. Receptores de esteróides. 3. Neoplasias ovarianas. 4. Receptor ERBB-2. 5. Prognóstico. I. Sarian, Luis Otávio Zanatta, 1974-. II. Derchain, Sophie Françoise Mauricette, 1959-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Expression of estrogen, progesterone, androgen and HER2 receptors in the epithelial ovarian cancer.

Palavras-chave em inglês:

Immunohistochemistry
Receptors, Steroid
Ovarian neoplasms
Receptor, ERBB-2
Prognosis

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luis Otávio Zanatta Sarian [Orientador]
Gilberto Uemura
Lúcia Helena Simões da Costa Paiva

Data da defesa: 13-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: MARIA CAROLINA SZYMANSKI DE TOLEDO

Orientador: Prof. Dr. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

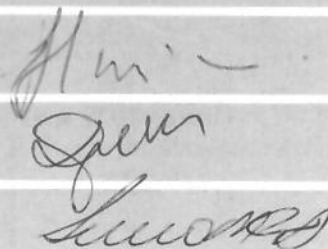
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

Membros:

1. Prof. Dr. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

2. Prof.Dr. GILBERTO UEMURA

3. Prof^a. Dr^a. LÚCIA HELENA SIMÕES DA COSTA PAIVA



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

Data: 13/11/2012

Dedico este trabalho...

*À pessoa que sempre me mostrou a grandiosidade do mundo,
dos pequenos atos e do aprimoramento constante,
minha mãe, Carmen Zilda Pereira de Toledo.*

*À minha família – consanguínea ou não – e,
aos meus amigos que sempre estiveram presentes quando precisei.*

*Às pacientes deste estudo,
que, mesmo em meio à sua dor e sem nenhuma recompensa,
participaram deste estudo apenas no intuito de ajudar o próximo.*

*A Deus e seus anjos,
em todas suas formas, terrenas e espirituais,
que nos fazem seguir em frente...*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian, sempre atencioso e com muita paciência diante as minhas ansiedades profissionais.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Sophie Derchain, pessoa de grande valor e conhecimento, por quem tenho um grande carinho.

Aos membros da banca de qualificação, que com seu conhecimento e dedicação, contribuíram no aprimoramento deste trabalho.

Aos meus queridos amigos que dispensaram atenção e carinho durante a elaboração desta tese.

Aos Prof. Dr. José Vassalo, Dr^a. Geise, Dr^a. Glauce Pinto e Dr^a. Marisa do Laboratório de Patologia Experimental, sem os quais a execução da parte experimental deste trabalho não seria possível.

Aos funcionários do SAME e do Ambulatório de Oncologia do CAISM que, sempre solícitos, viabilizaram o atendimento às pacientes e o levantamento de dados clínicos.

À equipe profissional do Hospital AC Camargo, responsável pela elaboração dos microarranjos de tecido.

Financiamento

Este estudo foi parcialmente financiado:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

processo no. 2012/15059-8.

O estudo teve a participação dos Departamentos de
Tocoginecologia do CAISM - Unicamp,
Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp,
Laboratório de Patologia Experimental do CAISM
e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo.



*"Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida é viver com paixão
Perder com classe e vencer com ousadia
Pois o triunfo pertence a quem mais se atreve
E a vida é muito para ser insignificante."*

(Charles Chaplin)

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	x
Resumo	xii
Summary	xv
1. Introdução	18
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Publicação.....	30
4. Conclusões.....	50
5. Referências Bibliográficas.....	52

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- ACO** – Anticoncepcionais combinados orais
- AINH** – Anti-inflamatório não hormonal
- BRCA1** – Gene do câncer de mama 1 (*breast cancer 1*)
- BRCA2** – Gene do câncer de mama 2 (*breast cancer 2*)
- CAISM** – Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- CI/IC** – Intervalo de confiança (*Confidence interval*)
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- et al.*** – E outro(s); e outra(s)
- FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- HER2** – *Human epithelial growth factor subtype 2*/ receptor estimulador de crescimento epitelial – subtipo 2
- IHQ/IHC** – Imuno-histoquímica (*immunohistochemistry*)
- IMC** – Índice de massa corporal
- INCA** – Instituto Nacional do Câncer

- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- RA/AR** – Receptor de andrógeno (*androgen receptor*)
- RE α/β** – Receptor de estrógeno alfa e beta
- ER α/β** – *Estrogen Receptor* alpha and beta
- RP/PR** – Receptor de progesterona (*progesterone receptor*)
- TH** – Terapia hormonal
- TMA** – Microarranjo de tecidos (*tissue microarray*)
- TNEOC** – Triple negative epithelial ovarian cancer
- UNICAMP** – Universidade Estadual de Campinas
- USA** – Estados Unidos da América (*United States of America*)

Resumo

Introdução: o câncer de ovário é comumente diagnosticado em estágios avançados, sendo atualmente a neoplasia ginecológica de maior letalidade. As pesquisas têm direcionado esforços na tentativa de descobrir novos fatores prognósticos e métodos terapêuticos. Muitos trabalhos estudam a expressão dos receptores de esteroides (dentre eles, estrógeno (RE), progesterona (RP) e andrógeno (RA)) e HER2 (receptor estimulador de crescimento epitelial – subtipo 2) como fatores prognósticos e associados à resposta terapêutica, apresentando; entretanto, resultados conflitantes. Até onde conhecemos, não há estudos desta natureza no Brasil. **Objetivo:** Correlacionar a expressão dos RE, RP, RA e HER2 aos fatores clínico patológicos, ao intervalo livre de doença e à sobrevida nos cânceres epiteliais de ovário. **Material e métodos:** Este é um estudo observacional de coorte retrospectiva. Foram incluídas 152 mulheres com tumores epiteliais malignos, selecionados através dos prontuários no período de 1993 a 2008, no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, São Paulo, Brasil. A avaliação da expressão dos RE [subtipos alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$)], RP, RA e HER2 foi realizada por imunohistoquímica através da construção de microarranjos de tecidos

(TMA). Inicialmente, foi realizada análise uni variada da expressão dos receptores acima quanto à idade, estado menopausal, índice de massa corpórea (IMC), tipo histológico, grau histológico, estadiamento inicial de acordo com a classificação proposta pela FIGO e presença de doença residual pós-tratamento cirúrgico. Em seguida, as pacientes foram divididas em dois grupos: ausência da expressão de RE α , RP e HER2 (triplo negativo) e positividade para pelo menos um desses receptores (não triplo negativo); e, avaliadas em relação aos critérios clínicos e epidemiológicos acima. Foram, então, realizadas análises multivariadas dos padrões de expressão de RE α e β , RP, RA, HER2 e triplo negativo em relação a estes mesmos critérios. Por fim, análise de sobrevida multivariada foi realizada utilizando-se todos os padrões de expressão e os fatores clínicos epidemiológicos estudados. **Resultados:** Nas análises multivariadas, mostraram-se significativas as seguintes associações: do receptor de estrógeno alfa (ER α) com tumores de grau histológico menos diferenciado ($p=0.01$); do receptor de progesterona (RP) à obesidade ($p= 0.01$); do receptor de andrógeno (RA) com tumores do subtipo seroso ($p= 0.01$); do receptor de HER2 com tumores dos graus histológicos II-III ($p=0.02$); do subgrupo triplo negativo com tumores de grau histológico menos diferenciado (II-III) ($p<0.01$). Não houve associação do RE β com nenhum dos fatores estudados. Quanto à análise multivariada de sobrevida livre de doença e sobrevida global; dentre os padrões de expressão de receptores, apenas o RE α esteve associado com melhor sobrevida livre de doença (RR=0.39; 95%CI 0.17 - 0.90). **Conclusões:** A expressão do RE α esteve mais significativamente associada a fatores clínicos de pior prognóstico. O RP esteve associado à obesidade. O

RA esteve significativamente mais presente nos tumores serosos. A expressão do HER2 e a presença de tumores triplo negativo foram maiores em tumores menos diferenciados. Paradoxalmente; o RE α foi o único receptor a apresentar associação com maior sobrevida livre de doença apesar de sua relação significativa com fatores reconhecidos de pior evolução clínica. Não houve diferença estatística significativa na análise multivariada de sobrevida total e sobrevida livre de doença quanto ao grupo de tumores triplo negativo.

Palavras-chave: câncer de ovário, tissue microarray, receptor, estrógeno, progesterona, andrógeno, erbB-2, triplo negativo

Summary

Introduction: Ovarian cancer is commonly diagnosed in advanced stages and currently is the most lethal gynecological malignancy. Surveys have focused efforts in an attempt to discover new prognostic and therapeutic methods. A plenty of studies investigates the expression of steroid receptors (among them, estrogen (ER), progesterone (PR) and androgen AR)) and HER2 (epidermal growth receptor stimulator - subtype 2) as prognostic factors and associated to therapeutic response, presenting, however, conflicting results. As far as we know, there are no studies of this nature in Brazil. **Objective:** The aim of this study was to correlate the expression of ER (subtypes α (ER α) and β (ER β), PR, AR and HER2 to clinical pathological factors, the disease-free survival and overall survival of epithelial ovarian cancers. **Methods:** This is a retrospective observational cohort study. The study included 152 women with malignant epithelial tumors, selected through the records from 1993 to 2008, in the Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) at the State University of Campinas - UNICAMP, São Paulo, Brazil. The expression of ER (α and β), PR, AR and HER2 was evaluated by immunohistochemistry through tissue microarray (TMA) technique. Initially, univariate analyses were performed, evaluating the expression of each receptor

mentioned above to age, menopausal status, body mass index (BMI), histological type, histological grade, initial staging as preconized by FIGO staging of ovarian tumors and presence of residual disease after surgical treatment. Then, the patients were divided into two groups: absence of the expression of ER α , PR and HER2 (triple negative) and positive for at least one of these receptors (not triple negative), and evaluated in relation to the clinical and epidemiological criteria mentioned above. Multivariate analyzes were performed with ER α , ER β , PR, AR, HER2 and triple negative towards these same criteria. At last, multivariate survival analyses were conducted using all the patterns of receptors' expression, epidemiological and clinical factors studied. **Results:** In multivariate analyzes, there were the following significant associations: of the estrogen receptor alpha (ER α) with less differentiated histological grade tumors (p = 0.01); of the progesterone receptor (PR) to obesity (p = 0.01); of the androgen receptor (AR) with the serous tumors (p = 0.01); of the HER2 receptor with tumors of histological grades II-III (p = 0.02); of the triple negative subgroup with less differentiated histological grade tumors (II-III) (p <0.01). There was no association of the ER β with any of the factors studied. In the multivariate analysis of disease-free survival and overall survival; considering the patterns of receptors' expression, only the ER α expression was associated with better disease-free survival (RR= 0.39, 95% CI 0.17 to 0.90). **Conclusions:** The expression of ER α was more significantly associated with clinical factors of poor prognosis. The PR was associated with obesity. The AR was significantly more prevalent in serous tumors. The HER2 expression and the presence of triple negative epithelial ovarian cancer tumors were higher

in less differentiated tumors. Paradoxically, the ER α was the only receptor which showed association with better disease-free survival despite its significant relationship with recognized factors of worse clinical outcome. There was no statistically significant difference in multivariate analysis of overall survival and disease-free survival regarding to the triple negative group.

Keywords: ovarian cancer, tissue microarray, receptor, estrogen, progesterone, androgen, erbB-2, TNEOC.

1. Introdução

O câncer de ovário é a neoplasia ginecológica de maior letalidade nos países ocidentais [1]. De acordo com o GLOBOCAN 2008, a estimativa foi de 225.000 novos casos de câncer de ovário pelo mundo com uma estimativa de óbito de 140.000 [2]. Nos países em desenvolvimento, 125.000 novos casos foram diagnosticados e 75.000 mulheres foram a óbito em decorrência da doença (60%). As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2012 indicam que 6190 mulheres serão diagnosticadas no Brasil este ano, sendo o 7º câncer mais incidente (excetuando os tumores de pele não melanoma) na maioria das regiões do país. O estado de São Paulo apresenta uma taxa estimada, para 2012, de 7,98 casos para cada 100.000 mulheres [3].

O câncer de ovário é uma doença que demonstra grande heterogeneidade morfológica e clínica. Sua classificação, feita pela Organização Mundial da Saúde – OMS [4], está baseada em alterações das células do epitélio de superfície celômica, germinativas e mesenquimais. Apesar desta heterogeneidade celular, a maioria dos tumores é derivada das células da superfície epitelial que é o

equivalente no adulto ao epitélio mülleriano [5]; por isso há semelhança entre os tumores serosos e o epitélio da tuba uterina, os endometrioides com o endométrio e os mucinosos com o epitélio endocervical [6]. Os tumores epiteliais são subdivididos, em sua grande maioria, em: serosos, mucinosos, endometrioides, células claras, tumores de células transicionais (tumores de Brenner) e tumores epiteliais mistos [4,7].

O câncer de ovário também é estratificado de acordo com a sua expressão genética. Seguindo este critério, eles se dividem em subtipo 1: crescimento lento/indolente e subtipo 2: crescimento mais agressivo [8]. O subtipo 1 corresponde a 25% dos cânceres de ovário e possui mutações nos genes KRAS, BRAF, PTEN e b-catenina. Já o subtipo 2 abrange a maioria dos tumores epiteliais e possui mutação no gene TP53 [9].

Devido à localização profunda intra-abdominal, à grande variação na apresentação clínica destes tumores e aos sintomas clínicos inespecíficos, a apresentação de doença avançada é mais frequente [10]; desta forma, é difícil caracterizar alterações iniciais e lesões precursoras na superfície do epitélio ovariano [11].

Um dos fatores de risco mais estudado para câncer de ovário é a história familiar para câncer de ovário ou mama [12]. As mutações confirmadas para os genes BRCA 1 e 2 e o diagnóstico de câncer de cólon hereditário não polipoide também são considerados fatores de risco para esta neoplasia maligna [13].

Obesidade, tabagismo e reposição hormonal estão sendo estudados como possíveis fatores de risco, porém com resultados ainda não conclusivos [10].

Devido aos fatores já elencados: alta heterogeneidade, ausência de fatores de risco conclusivos e difícil diagnóstico precoce; o câncer de ovário mantém-se como uma doença de alta letalidade. Uma vez diagnosticado tardiamente (75% dos casos são diagnosticados no estágio avançado – FIGO III e IV [14]), não há, até o momento, quimioterapia ou tratamento adjuvante capaz de diminuir a alta letalidade deste câncer. Acredita-se que a resposta terapêutica seja influenciada pela alta variância molecular entre os tumores; assim, entender os mecanismos de resposta tumoral ao meio é condição *sine qua non* para identificar novos fatores prognósticos e auxiliar no desenvolvimento de novas terapias alvo-específicas [15].

Considerando-se que a maioria dos tumores ovarianos origina-se das células epiteliais (*Ovarian Surface Epithelium*) ou das invaginações deste epitélio no estroma ovariano (cistos de inclusão) é possível que estes tumores estivessem sob a influência dos fatores de crescimento encontrados nestes tecidos [16]. Esta teoria baseia-se nas seguintes observações: o efeito preventivo dos anticoncepcionais orais [17], ativando vias de proteção molecular no tecido ovariano; a descrição de alterações pré-malignas e displásicas neste tecido superficial [5]; a associação com a perda da atividade de supressão tumoral e/ou a sobre-expressão da enzima ciclo oxigenase 2 no epitélio com alterações displásicas [63]; a presença de um epitélio de transição com células com características pré-neoplásicas em câncer de ovário diagnosticado precocemente [18].

Há, atualmente, inúmeras teorias para a carcinogênese do tumor de ovário, figurando entre elas a teoria da ovulação incessante [19]. Acredita-se que as lesões causadas pela ovulação e seu consequente reparo possam levar a falhas no mecanismo de reparo celular e, assim, ao desenvolvimento de lesões malignas [20]. Giles propôs, em 2010, um interessante modelo animal para testar esta teoria e concluiu que o número dos ciclos ovulatórios é diretamente proporcional ao risco para desenvolvimento de câncer de ovário [16]. Além disso, observa-se que a presença de alterações na expressão do gene p53 está relacionada ao número de eventos ovulatórios, e o primeiro está relacionado ao câncer de ovário [21]. Dados clínicos importantes que corroboram esta teoria são a gravidez e o uso de anticoncepcionais, que estão intimamente relacionados à diminuição dos ciclos ovulatórios e, conseqüentemente, do risco para câncer de ovário.

Entretanto, apenas a ausência de ciclos ovulatórios não é capaz de explicar satisfatoriamente a diminuição deste risco, uma vez que mulheres inférteis apresentam menos ciclos ovulatórios e são, todavia, consideradas um grupo com maior risco para câncer de ovário. Isto levou a novas pesquisas que sugerem outras hipóteses, como: a) hipóteses das gonadotropinas [22] atuando como efeito estimulador para a transformação neoplásica da superfície do epitélio ovariano; b) a hipótese hormonal que sugere que os hormônios esteroidais possam atuar diretamente sobre o epitélio ovariano e promover (estrógenos e andrógenos) ou proteger (progestinas) contra a carcinogênese [23]; e c) a hipótese inflamatória que argumenta que os mediadores inflamatórios liberados durante a ovulação ou em doenças como a endometriose possam danificar o tecido ovariano e tubário [24].

O efeito da expressão de receptores de esteroides na carcinogênese e na evolução dos cânceres ginecológicos (mama, endométrio) é estudado há mais de 20 anos [25]. Ao longo dos anos, tais estudos têm direcionado atenção ao câncer de ovário [26]. Nos cânceres de mama e endométrio esta associação é mais bem definida, sendo a negatividade para estes receptores no carcinoma de mama considerada um fator de mau prognóstico [27,28]; enquanto que a perda da expressão do receptor de estrógeno está associada a maus resultados no câncer endometrial [29].

Segundo a revisão de Hunn [10], uma evidência crescente sugere que o epitélio ovariano é hormonalmente responsivo e está sujeito às concentrações hormonais em seu meio; apresentando receptores para a maioria das classes hormonais e para alvos não hormonais, como o HER2. Desta forma, estudos recentes têm demonstrado que os hormônios reprodutivos podem ter efeitos biológicos neste epitélio; i.e., progesteronas parecem induzir apoptose celular (desta forma o efeito dos anticoncepcionais combinados orais (ACO) e da gravidez seriam não só inibir a ovulação como também propiciar um ambiente repleto de progesterona) [30,31]. Em contrapartida, estrógenos e andrógenos teriam efeito estimulador sobre esse epitélio (uso de TH principalmente como monoterapia com estrógeno [32]) e o balanço da expressão destas moléculas teria impacto no risco e na evolução clínica do câncer de ovário [33].

Supõe-se que o efeito dos esteroides sobre o câncer de ovário é dependente não só da presença dos mesmos, mas também da expressão dos seus receptores no tecido ovariano [32]. As pesquisas com receptores de

esteroides apresentam resultados controversos devido à grande heterogeneidade dos tumores e das diversas formas empregadas na identificação dos receptores [34]. Inicialmente, o estudo da expressão de receptores esteroides nestes tumores era feito através da técnica semi-quantitativa de *dextran-coated charcoal* (DCC) e, mais recentemente, pela imunohistoquímica (IHQ). O primeiro era limitado pela alta prevalência de falsos positivos, uma vez que avaliava a concentração destes esteroides no tecido e não a presença de receptor específico no tecido estudado [28]. Assim, alguns estudos acharam associação do receptor de estrógeno com idade, estágio, grau, sucesso cirúrgico e resposta à quimioterapia enquanto outros não encontraram tais associações [26].

A técnica da IHQ vem sendo aplicada nos estudos mais recentes, e permitiu a identificação de inúmeras implicações biológicas e clínicas para a expressão dos receptores esteroides em neoplasias ginecológicas. Estudos com IHQ, por exemplo, no adenocarcinoma endometriode do endométrio demonstraram que eles são positivos para receptor de estrógeno, progesterona e negativos para p53, enquanto que os adenocarcinomas serosos e serosos papilíferos costumam ser negativos para estrógeno, progesterona e expressam p53 aberrante e Ki67 em boa parte das células [35].

O ovário expressa distintivamente receptores de estrógeno e progesterona, sendo que a presença destes o diferencia do mesotélio do peritônio [36,37]. A ação do receptor de estrógeno é mediada por dois receptores de estrógeno, alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$), (pertencentes à superfamília de receptores nucleares) que através da regulação sobre a transcrição de genes têm efeitos contrários

no crescimento das células do câncer de ovário [38]. Acredita-se que o RE β teria um efeito protetor quanto à atividade mutagênica do RE α , estando, por conseguinte, diminuído no câncer de ovário [39,40]. Entretanto alguns trabalhos que avaliaram a expressão de RE β por mRNA demonstraram que a variante RE β 5 é frequentemente expressa no câncer de ovário com efeito contrário das demais variantes [41]; assim como a transição da expressão do receptor de estrógeno beta do núcleo para o citoplasma acarretaria em perda de sua função antagonica e consequentemente pior evolução clínica [42].

Já o receptor de progesterona (RP) (membro também da superfamília de receptores nucleares) estaria subdividido em subtipos A e B estruturalmente semelhantes, porém com atividades complementares (o subtipo A teria efeito supressor sobre o receptor de estrógeno enquanto que o subtipo B seria um potente estimulador na expressão de genes dependentes da progesterona) [43,44].

Os mecanismos pelos quais estrógeno e progesterona interagem na expressão clínica do câncer de ovário ainda não são compreendidos. Modelos experimentais tais como o de Langdon [45]; demonstraram um efeito regulatório do estrógeno sobre a progesterona. A hipótese mais aceita é que o estrógeno – principalmente aquele presente nos folículos ovulatórios – teria efeitos genotóxico e mitogênico nas células superficiais do ovário. Halon [1] encontrou uma expressão menor de receptor de estrógeno alfa entre aquelas pacientes com menor sobrevida e tempo livre de doença. Em contrapartida, dados epidemiológicos sugerem que o estado de alta concentração de progesterona

teria um efeito protetor por induzir apoptose. Alguns estudos testaram tais teorias com o uso de antiestrogênicos, inibidores de aromatase e progestinas isoladamente ou em conjunto com quimioterapia [46], mas os resultados não são conclusivos e o uso destes agentes não faz parte dos protocolos de tratamento para neoplasias do epitélio ovariano.

Entre os andrógenos, há dados que suportam seu efeito estimulador sobre o câncer de ovário: o receptor de andrógeno (RA) é frequentemente encontrado nos cânceres ovarianos, medicações antiandrogênicas inibem o crescimento tumoral, situações como síndrome dos ovários policísticos aumentam o risco para câncer de ovário e apresentam altos níveis de andrógenos circulantes e o uso de drogas androgênicas pode aumentar o risco para câncer de ovário [47]. Entretanto alguns estudos demonstram que a atividade exacerbada do gene que codifica o receptor de andrógeno pode inibir a carcinogênese ovariana [43,48]. Alguns trabalhos demonstram que o RA está presente em 30 – 40% dos casos. De forma geral, a expressão do RA não está associada com a evolução clínica, mas é um fator prognóstico favorável com o subtipo seroso [49,50] o que demonstra a grande dificuldade de compreensão do seu papel no câncer de ovário.

O receptor HER2/neu (*Human Epidermal Growth Factor receptor 2*) é um receptor de fator de crescimento relacionado à atividade da tirosina quinase codificado pelo protooncogene erbB-2 (HER2) encontrado no cromossomo 17q11. Ele faz parte de uma família de receptores que inclui HER1 (EGFR), HER3 e HER4. O HER2, assim como os demais, é um receptor transmembrânico e sua ativação inicia uma cascata intracelular que regula o crescimento, a

diferenciação, a mobilidade, a adesão e a apoptose celular [51]. Diversos estudos têm demonstrado um papel central da expressão do receptor HER2 na carcinogênese. [52]. Sua expressão nos cânceres de mama tem sido associada ao pior prognóstico [53]. Supõe-se que sua expressão no câncer de ovário seja de aproximadamente 20 a 30% com efeito negativo sobre a evolução clínica, porém ainda com resultados controversos [54,55].

Atualmente, há um crescente interesse no estudo da expressão concomitante dos receptores hormonais e não hormonais no câncer de ovário. De acordo com Liu [56] apesar dos inúmeros trabalhos avaliando individualmente cada um desses alvos moleculares (HER-2, Ki-67, receptor de estrógeno, progesterona e andrógeno e p53) e seus resultados discrepantes; não há nenhum trabalho que avalie a expressão negativa concomitante de estrógeno, progesterona e HER-2 (câncer de ovário triplo negativo – TNEOC). No câncer de mama, essa expressão hormonal esta associada à maior agressividade e pior prognóstico [57]. Liu [15] realizou recentemente um trabalho com intuito de avaliar a existência de um triplo negativo no câncer de ovário assim como existente na mama. Este autor caracterizou um grupo de 15,5% dos tumores epiteliais serosos de ovário como sendo triplo negativo e encontrou que o TNEOC está associado à pior sobrevida e menor intervalo livre de doença; entretanto enfatiza que mais estudos são necessários para averiguar essa associação e seus efeitos sobre a evolução clínica das pacientes.

A cada ano, a expectativa de vida das mulheres aumenta e, por conseguinte mais mulheres serão diagnosticadas com câncer de ovário. O

conhecimento do papel dos receptores hormonais e não hormonais na evolução do câncer de ovário é de suma importância no esclarecimento dos fatores prognósticos e no desenvolvimento de terapêuticas mais adequadas a esta neoplasia. Desta forma, investiga-se se diferentes padrões de expressão destes receptores refletem no comportamento tumoral e na resposta terapêutica destas pacientes. Há, por outro lado, um crescente interesse em definir subgrupos de expressão molecular tais como o triplo negativo para cânceres epiteliais de ovário – assim como no carcinoma de mama – e se, este subgrupo em particular teria uma expressão clínica diferente dos demais. Caso afirmativo, talvez seja possível aperfeiçoar o tratamento assim como já tem sido feito no câncer de mama, com melhores resultados de sobrevida e mortalidade.

É biológica e clinicamente plausível que a expressão de receptores de esteroides e do HER2 guarde relação com características morfológicas e com o comportamento clínico de tumores epiteliais ovarianos, assim como ocorre com as neoplasias da mama. Contudo, a heterogeneidade dos tipos histológicos das neoplasias epiteliais de ovário e sua relativamente baixa incidência impedem que as investigações sobre o assunto ocorram na mesma velocidade que os estudos relacionados ao câncer de mama. Neste estudo, tiramos proveito da disponibilidade de material para análise destes marcadores em uma coorte relativamente numerosa de mulheres com câncer epitelial do ovário, com informações clínicas de seguimento em médio e longo prazo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação da expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, andrógeno, HER2 e do grupo de tumores triplo negativo (receptor de estrógeno alfa, de progesterona e HER2 negativos) em tumores invasores epiteliais de ovário e seu comportamento clínico.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, andrógeno, HER2 e do grupo de tumores triplo negativo (receptor de estrógeno alfa, de progesterona e HER2 negativos) nos tumores epiteliais invasivos de ovário.
- Correlacionar a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, andrógeno, HER2 e do grupo de tumores triplo negativo (receptor de estrógeno alfa, de progesterona e HER2 negativos) nos tumores epiteliais invasivos de ovário com a idade, a menopausa, o IMC, o

grau e o tipo histológico, o estadiamento pela FIGO e a presença e doença residual.

- Correlacionar a expressão de receptores de estrógeno, progesterona, andrógeno, HER2 e do grupo de tumores triplo negativo (receptor de estrógeno alfa, de progesterona e HER2 negativos) com a sobrevida geral e intervalo livre de doença.

3. Publicação

Gynecologic Oncology

Contact us
Help ?

>> Important security enhancements! [Read more...](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: luis.sarian
Role: Author

Version: EES

Submissions Being Processed for Author Luis Sarian, M.D., Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions)Display ALL results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail		Analysis of the contribution of HER2 and steroid receptors to the risk of disease recurrence and death in women with epithelial ovarian cancer	Nov 25, 2012	Nov 25, 2012	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)Display ALL results per page.

----- Forwarded message -----

From: Gynecologic Oncology <gyn@elsevier.com>
Date: Sun, Nov 25, 2012 at 4:05 PM
Subject: Gynecologic Oncology: Submission Confirmation
To: luis.sarian@gmail.com

Title: Analysis of the contribution of HER2 and steroid receptors to the risk of disease recurrence and death in women with epithelial ovarian cancer
Corresponding Author: Prof. Luis Sarian
Authors: Maria Carolina de Toledo; Luis Felipe Sallum; Liliana Andrade; Geisi Paiva; Glauce Aparecida Pinto; Fernando Augusto Soares; Sophie Derchain

Dear Prof. Sarian,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Gynecologic Oncology. Your manuscript will undergo a quick screening process to ensure that it meets all submission requirements. Please note that if your manuscript does not meet all submission requirements, it will be returned to you without being seen by an editor or reviewers.

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

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

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

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

Kind regards,

Editorial Office
Gynecologic Oncology
Elsevier
525 B Street, Suite 1800
San Diego, CA 92101-4495
USA
Fax: +1 (619) 699-6700
E-mail: gyn@elsevier.com

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Analysis of the contribution of HER2 and steroid receptors to the risk of disease recurrence and death in women with epithelial ovarian cancer

Authors:

Maria Carolina Szymanski de Toledo¹, M.D.

Luis Otavio Sarian¹, M.D, PhD.

Luis Felipe Sallum¹, M.D.

Liliana Lucci Angelo Andrade², M.D, PhD.

Geisi Paiva^{2,4}, M.D., PhD.

Glauce Aparecida Pinto⁴, PhD.

Fernando Augusto Soares³ M.D., PhD.

Sophie FM Derchain¹, M.D., PhD.

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

2. Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

3. Department of Pathology, Hospital do Câncer A C Camargo, Fundação Antonio Prudente de São Paulo, Brazil

4. Laboratory of Experimental Pathology, CAISM– Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil.

Address for correspondence:

Luis Otávio Sarian

Email: sarian@unicamp.br

Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Caixa postal 6111

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Phone 0 55 19 35219305/ Fax 0 55 35219516

Acknowledgements

This study was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,

FAPESP

Abstract

Objectives: We aimed to assess associations between steroid receptors including estrogen-alpha ($ER\alpha$) -beta ($ER\beta$), androgen receptor (AR) and progesterone receptor (PR); the HER2 status; and the triple-negative epithelial ovarian cancer ($ER\alpha$ -/PR-/HER2-; TNEOC) status and survival in women with epithelial ovarian cancer (EOC). **Methods:** 152 women with primary EOC were selected for this study. Steroid receptor and HER2 statuses were determined by immunohistochemistry. Disease-free and overall survival were calculated and compared with steroid receptor and HER2 statuses as well as clinicopathological features of EOC using the Cox Proportional Hazards model. **Results:** A mean follow-up period of 43.6 months (interquartile range = 41.4 months) was achieved where 44% of patients had serous EOC, followed by mucinous (23%), endometrioid (9%), mixed (9%), undifferentiated (8.5%) and clear cell tumors (5.3%). $ER\alpha$ staining was associated with grade II–III tumors. PR staining was positively associated with a Body Mass Index ≥ 25 . AR positivity was higher in serous tumors. In stand-alone analysis of receptor contribution to survival, $ER\alpha$ positivity was associated with greater disease-free survival. However, there was no significant association between steroid receptor expression, HER2 status, or TNEOC status, and overall survival. **Conclusions:** Although $ER\alpha$, PR, AR and HER2 were associated with key clinical features of the women and pathological characteristics of the tumors, these associations were not implicated in survival. Interestingly, women with TNEOC seem to fare the same way that their counterparts with non-TNEOC.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Keywords: ovary, cancer, estrogen, progesterone, androgen, HER2, receptors, tissue microarray, triple negative.

Introduction

The histopathological heterogeneity of epithelial ovarian carcinomas (EOC) precludes straightforward determination of individual tumor characteristics associated with clinical behavior and prognosis. In recent years, molecules such as the human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), and the steroid receptors, estrogen (ER), progesterone (PR) and androgen (AR), have been tested as potential markers of individualized clinical behaviors of cancer. Steroid hormones normally regulate physiological processes in the ovaries and have been implicated in the pathogenesis of breast cancer as well as gynecological cancers such as endometrial and ovarian carcinomas (EOC) [1].

Contrary to what is known for breast cancer, where ER, PR and HER2 statuses bear clear prognostic and predictive significance; the clinical significance of these molecules in EOC remain unclear. Indeed, while the expression of PR has been shown to predict better prognosis [2], whereas a positive ER status has been associated with a negative prognosis of EOC, these associations require further clarification [3, 4]. Likewise, conflicting results have been reported regarding the relationship between EOC progression and the statuses of the AR and HER2 [5-7]. Recently, one group suggested that the subgroup of “triple negative epithelial ovarian cancer” (TNEOC), i.e., tumors that do not express ER (subtype alpha ($ER\alpha$)), PR and HER2, are significantly more aggressive and display a poorer prognosis than non-TNEOC tumors, replicating what is known to be true for breast cancer [8, 9]. However, all the findings cited above have been restricted to small patient subsets and more conclusive data can only be derived from the summation of several individual studies.

In a previous study, we examined the associations between $ER\alpha$ and PR with pathological features of borderline ovarian tumors and EOC as well as the clinical outcomes

(disease-free and overall survival) [10]. In that study, we found no difference in patient survival in relation to these markers. In the present investigation, after a comprehensive update of the clinical data, we restricted our analyses to women with EOC, and expanded the panel of markers to include a more comprehensive set of molecules: ER α and - β , PR, AR, and HER2. We also incorporated an analysis comparing the clinical outcome of women with TNEOC to that of women with other steroid receptor/HER2 expression setups. We believe our new and relatively extensive findings may contribute to a field in which knowledge acquisition is retarded due to limitations in sample size and homogeneity.

Subjects and methods

Patient selection

This study was approved by the ethical committee of the Faculty of Medical Sciences (protocol CEP#1086/2009), State University of Campinas (Unicamp). A total of 172 Brazilian women with primary EOC who had been attended to by our services between 1993 and 2008, followed up until December 2010, and had paraffin confirmed diagnosis were included for analysis. This sample was later reduced to 152 women due to technical constraints in assessing the statuses of the steroid receptors and HER2. We also assessed patient medical records to collect key clinical and epidemiological data. Surgeries were performed as defined by International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging for ovarian cancer. In addition, biopsies were examined by histopathology, and the grade and disease stage were determined according to the WHO criteria, Gynecologic Oncology Group criteria, and the FIGO systems. All patients who underwent adjuvant therapies were treated with cisplatin-based chemotherapy. The exclusion criterion was

patients who had previously undergone chemotherapy. We also assessed the time elapsed between the primary surgical treatment and recurrence (disease free survival) and time of death (overall survival).

Specimens

Tumor specimens were obtained at the first laparotomy before any other treatment. Slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) were generated from the original paraffin blocks that were analyzed for the selection of EOC. A tissue microarray (TMA) was designed after selection of the most representative areas by an experienced pathologist. Two areas of interest corresponding to the most representative areas of the tumor were marked and selected from each case for TMA construction. These marks guided the 1.0mm cylindrical core of the paraffin blocks, which was performed using a tissue microarray instrument (TMA, Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Springs, CA, USA). Sections from the TMA were placed on electrostatically charged slides for immunohistochemical evaluation of the ER, PR, AR and HER2 statuses.

Assay methods

Immunohistochemistry (IHC):

Immunohistochemistry was performed to detect the expression of ER, PR, AR and HER2 in 152 EOC samples. Briefly, sections were deparaffinized with xylol and dehydrated in alcohol series. Endogenous peroxidase activity was blocked by using 0.3% hydrogen peroxide, followed by washes with distilled water. For antigen retrieval, we used a commercially available pressure cooker (Pascal, supplied by Dako, Carpinteria, CA, USA), in which slides were immersed in citrate buffer pH 6 for 30 minutes. The slides were

dried at room temperature and washed in distilled water. After, the sections were incubated in a moist chamber, with the specific primary antibodies at 4°C, overnight (Dako; HER-2: clone c-erbB-2 Oncoprotein, Dako; ER alpha: clone 1D5 1:1000, Dako; PR: clone PgR 636 1:800, Dako; ER beta: clone 14C8 1:600, Dako; AR clone AR441 1:10). The slides were then washed in PBS, pH 7.4, then incubated in Advance™ HRP Detection System (Dako) at 37°C for 1 hour, and washed in PBS. For detection, DAB chromogenic substrate (3'-diaminobenzidine, SIGMA, St Louis, MA, USA) was applied, at the proportion 0.06g to 100ml of PBS, 500µl hydrogen 3% peroxide and 1ml dimethylsulfoxide (DMSO) at 37°C for 5 minutes. Finally, the slide was washed in tap water and counterstained with Harris' hematoxylin. After being dehydrated, slides were mounted in resin (Entellan®, Merck, Darmstadt, Germany). Internal and external, positive and negative controls were used to validate the reactions. Stained cells in each tissue were counted under a light microscope by an experienced pathologist.

Image analysis

The IHC staining was assessed independently by a single observer, blind to the clinical and pathological features of the disease. Two TMA sets of each tumor were used for each marker. In *post-hoc* analysis, if scores differed in the two analyses, the higher staining score (see below) was considered. Nuclear IHC staining was considered for ER- α , - β , PR and AR. The percentage of ER- α and - β , PR and AR IHC stained nuclei was further categorized into: (0) negative; (1): less than 1% of stained nuclei; (2) 1–10% of stained nuclei; (3) 10–35% of stained nuclei; (4) 35–70% of stained nuclei; (5) >70% of stained nuclei. The epithelial cell intensity was categorized as: 0, negative; 1, weak; 2, moderate; or 3, strong. The final score was calculated by adding the score obtained from the staining

intensity to that derived from the percentage of positive cells, thus achieving theoretical results ranging from 0 to 8. For statistical purposes, the final IHC ER/PR status was deemed positive when the score was ≥ 4 . Membrane IHC staining was examined for HER-2 where it was scored as (0): 0, (1+): $< 30\%$ of membrane stained positively (both scores were considered negative), (2+): $> 30\%$ of membrane stained positively with weak or moderate intensity, (3+): $> 30\%$ of membrane stained positively with strong intensity. For statistical purposes, the final IHC HER2 status was deemed positive when the score was $\geq 2+$.

Statistical analysis

All statistical calculations were performed with the R environment for statistical computing [11]. Confidence levels were set to 5%. Sample size calculations for the survival models were performed using the following parameters: 3 years accrual time, 5 years follow-up, difference of 10% in survival probabilities between groups, 80% power and 5% CI, resulting in 105 subjects with complete follow-up. This sample size does allow for subset survival analyses. We obtained 152 patients with complete follow-up and a mean follow-up period of 43.6 months (interquartile range = 41.4 months). Chi-squares, and Fisher's T test when necessary, were used to compare the clinical characteristics of the women in relation to the expression of the steroid hormones and to the TNEOC status. Then, two multivariate generalized linear models using the binomial distribution (logistic regression) were fit to adjust the p-values: one model including ER, PR, AR and HER2 statuses and the other containing the TNEOC status in lieu of its components (ER, PR and HER). Multivariate Cox Proportional hazards models were used to calculate the hazard ratios for overall survival (OS), defined as the time elapsed between the surgical procedure and disease-related death and disease-free survival (DFS), defined as the time elapsed

between the surgical procedure and the time of recurrence, in relation to the key clinical features of the women and the expression of the steroid receptors.

Results

For this study, the main clinical and pathological features of 152 women with EOC were recorded ([Table 1](#)). Briefly, mean patient age was 55.2 ± 12.3 years, and mean BMI was 27.2 ± 6.1 . Most patients (56%) had stage III–IV disease. Approximately 44% of the patients had serous EOC, followed by mucinous (23%), endometrioid (9%), mixed (9%), undifferentiated (8.5%) and clear cell tumors (5.3%). Seventy-one patients (46.7%) had tumors positive for ER α , contrasting to 95.4% for ER β .

Next, the statuses of steroid receptors and HER2 in patient-derived tumors were analyzed in relation to key epidemiological and clinical features of the patients and to the pathological features of the tumors ([Table 2](#)). The *p* values presented in the table were obtained by multivariate analysis (logistic regression). This statistical analysis revealed a significant association between high-grade (grade II–III) histology and ER α and HER2 positive statuses. The ER β status was not associated with any of the studied characteristics. Of note, women with a BMI ≥ 25 had a significantly higher proportion of PR positive tumors. While an AR positive status was significantly associated with serous histology. A triple-negative marker setup was found to be significantly more prevalent in grade I tumors. We also compared the steroid-receptors and HER2 statuses with disease-free survival as well as key epidemiological and clinical features ([Table 3](#)). In the left column, the hazard ratios (HR) were derived using a multivariate Cox model including the stand-alone receptor statuses, whereas in the right column only triple-negative status cases were included in the model. ER α positivity was significantly associated with greater disease-free survival (RR =

0.39; 95% CI 0.17 to 0.90). Overall survival in relation to the steroid receptor statuses was also examined ([Table 4](#)), and no significant associations were found.

Discussion

In our study, we aimed to study the associations between steroid receptor expression, HER2 status and key clinical and pathological features of EOC. In this investigation, we did not detect a significant relationship between the expression levels of the steroid receptors, ER β , PR, AR and HER2 and long-term clinical behavior of EOC. Women with TNEOC fared the same way as their counterparts with other receptor expression setups. On the other hand, ER α expression was found to be an independent predictor of better disease-free survival. Moreover, a significant association was detected between ER α and HER2 expression with grade II–III histology; whereas, TNEOC were more frequently associated with grade I. AR positivity was more prevalent in serous than non-serous tumors. Interestingly, PR staining was positively associated with obesity.

Of the five studied markers, ER α was the only molecule found to bear significant prognostic significance for women with EOC. In a recent report that examined 58 women with advanced serous ovarian cancer, tumors with cytoplasmic expression of ER β were found to bear a poorer prognosis than that predicted for non-expressing tumors, while ER α and PR statuses were not associated with survival [12]. However, the samples were restricted to serous tumors, whereas the samples in our study comprise a wide variety of EOC histological types, which may account for these differences. In another study, the lack of ER β expression was associated with poorer survival and a worse response to cisplatin-based chemotherapy, although the ER α status was not assessed [13]. Also recently, Chinese authors found that young women (40 years of age or less) with either serous or non-serous

ovarian cancer fared better if their tumors were ER α + /PR+, but ER α status alone was not an independent prognostic factor [14]. Danish authors of the MALignant OVArrian cancer (MALOVA) study reported similar findings, this time detecting an independent survival benefit in women with ER and/or PR-positive tumors (ER: HR, 0.80; 95% confidence interval (CI), 0.63–0.99; PR: HR, 0.69; 95% CI, 0.51–0.94) [4].

Halon and colleagues (2011) [13] presented findings that are in alignment with ours. They reported a significant association of ER α expression in specimens from primary laparotomies with cause-specific survival. In their study, for the cases terminated by death of the patient, the overall immunoreactivity score of ER α expression at the time of laparotomy was significantly lower than in surviving patients. In addition, Kaplan-Meier analysis revealed both significantly shorter overall survival and progression-free survival in cases with lower ER α expression. Arias-Pulido and colleagues (2009) [15] also examined the issue in 45 women with borderline ovarian tumors and 89 with EOC. For patients with EOC, the 5-year overall survival per ER–/PR+, ER+/PR–, ER+/PR+, and ER–/PR– expression set was 83%, 79%, 61%, and 48%, respectively, and these differences were statistically significant. In multivariate analyses, ER/PR expression patterns were found to be independent predictors of overall survival [15].

The proportion of PR positive EOC in our samples (69%) is similar to that found (72%) by Hecht and colleagues (2009) [16]. In that study, the PR-negative status was associated with higher histological grades and more advanced FIGO stage. Other pioneering studies found an association between positive PR status in EOC with better prognosis as well [17]. We did not find any association between the expression of PR and tumor grade or stage; but this fact can be due to low expression of PR in the serous tumors in our population. Interestingly, in our study, positive PR status was more common in obese

(BMI>25) women. The relationship between PR status and obesity in ovarian cancer has not been addressed before. Recently, a study showed that PR mRNA levels in obese (BMI > 25) breast cancer patients were significantly lower than that in non-obese women [18].

We also assessed the AR and HER2 statuses of the ovarian tumors. Epidemiological studies have implicated androgens in the etiology and progression of EOC since the majority of ovarian cancers are diagnosed after menopause, a time when the steroid output of the ovaries shifts from estrogens to androgens. Also intriguing is the fact that women with pre and postmenopausal high levels of serum androgens are at an increased risk of developing ovarian cancer [19]. Indeed, a group discovered that loss of coordinated AR-mediated regulation of TGF-Beta, leads to deregulated responses to androgens in an EOC cell model [20]. More recently, a Swedish study detected the reduced expression of androgen receptors in EOC when compared with that in the fallopian tubes. In serous fallopian tumors, the AR expression was associated with better prognosis [21]. In our sample, AR expression was associated with neither the pathological features of EOC nor disease-free/overall survival. We also found no relationship between the HER2 status and any of the pathological and clinical features of the cases. The same conclusions were reached by a German study group who found no relationship between the serological HER2/neu status of ovarian cancer patients, prognostic factors or progression-free/overall survival [7].

A recent report by Liu and colleagues (2011) [1] found that a subset of 18 TNEOC out of 116 EOC displayed a higher proportion of grade III histology compared with non-TNEOC in addition to higher levels of p53 and Ki67 expression [1, 8]. Also, TNEOC was associated with shorter disease-free survival and overall survival. In our study, we had 60 cases of TNEOC, comprising 39.5% of our sample. The prevalence of TNEOC in our sample is twofold that reported in the Liu's (2011) study (39.5% versus 15.5% in our

study). However, in our sample, women with TNEOC had similar disease-free and overall survival compared with women with non-TNEOC tumors.

In conclusion, scattered data seems to point towards prognostic significance for ER α in women with EOC. However, given the sample size and other limitations of the currently available studies, any conclusive interpretation of the association between steroid receptors, HER2 status and the prognosis of EOC is not warranted. Also, it is worth noting that although TNEOC have been reported to bear worse prognosis in a few pioneer studies, in the present sample of Brazilian women this association was not detected. We are convinced that a meta-analysis of the currently available studies concerning the relationships between steroid receptor expression and prognosis of ovarian tumors could yield interesting results, and our next efforts will be focused in that direction.

References

- 1) Liu N, Wang X, Sheng X. 'Triple negative' epithelial ovarian cancer and pathologic markers for prognosis [Review]. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011 Feb;23(1):19–23.
- 2) Lee P, Rosen DG, Zhu C, Silva EG, Liu J. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;96:671–7.
- 3) García-Velasco A, Mendiola C, Richardson D, Ballestín C, Colomer R, Cortés-Funes H. Prognostic value of hormonal receptors, p53, ki67 and HER2/neu expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2008;10:367–71.
- 4) Hodgall EV, Christensen L, Hodgall CK, Blaakaer J, Gayther S, Jacobs IJ, et al. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor tumor expression in Danish ovarian cancer patients: from the “Malova” ovarian cancer study. *Oncol Rep*. 2007;18:1051–9.
- 5) Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;159:319–35.
- 6) Hodgall EV, Christensen L, Hodgall CK, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, et al. Distribution of HER2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003;98:66–73.
- 7) Hoopmann M, Sachse K, Valter MM, Becker M, Neumann R, Ortmann M, et al. Serological and immunohistochemical HER-2/neu statuses do not correlate and lack prognostic value for ovarian cancer patients. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2010;19(6):809–15.
- 8) Liu N, Wang X, Sheng X. The clinicopathological characteristics of 'triple-negative' epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol*. 2010 Mar;63(3):240–3.
- 9) Chácon R, Constanzo M. Triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:S3.

- 10) Sallum LF, Sarian LO, Andrade LA, Vassallo J, Soares FA, Pinto GA, et al. Survival of women with ovarian carcinomas and borderline tumors is not affected by estrogen and progesterone receptor status. *J Gynecol Oncol*. Forthcoming 2012.
- 11) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (<http://www.R-project.org/>).
- 12) De Stefano I, Zannoni GF, Prisco MG, Fagotti A, Tortorella L, Vizzielli G, et al. Cytoplasmic expression of estrogen receptor beta (ER β) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011 Sep;122(3):573–9.
- 13) Halon A, Nowak-Markwitz E, Maciejczyk A, Pudenko M, Gansukh T, Györfy B, et al. Loss of estrogen receptor beta expression correlates with shorter overall survival and lack of clinical response to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Anticancer Res*. 2011 Feb;31(2):711–8.
- 14) Yang XY, Xi MR, Yang KX, Yu H. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor status in young Chinese ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*. 2009 Apr;113(1):99–104.
- 15) Arias-Pulido H, Smith HO, Joste NE, Bocklage T, Qualls CR, Chavez A, et al. Estrogen and progesterone receptor status and outcome in epithelial ovarian cancers and low malignant potential tumors. *Gynecol Oncol*. 2009 Sep;114(3):480–5.
- 16) Hecht J, Kotsopoulos J, Hankinson SE, Tworeger SS. Relationship between epidemiological risk factors and hormone receptor expression in ovarian cancer: results from the Nurses' Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(5):1624–32.

- 17) Kommoss F, Pfisterer J, Thome M, Schafer W, Sauerbrei W, Pfleiderer A. Steroid receptors in ovarian carcinoma: immunohistochemical determination may lead to new aspects. *Gynecol Oncol* 1992;47:317–22.
- 18) Esfahlan RJ, Zarghami N, Esfahlan AJ, Mollazadeh M, Nejati K, Nasiri M. The Possible Impact of Obesity on Androgen, Progesterone and Estrogen Receptors (ER α and ER β) Gene Expression in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer (Auckl)*. 2011;5:227–37.
- 19) Schildkraut JM, Bastos E, Berchuck A. Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:932–8.
- 20) Motamed-Khorasani A, Jurisica I, Letarte M, Shaw PA, Parkes RK, Zhang X, et al. Differentially androgen-modulated genes in ovarian epithelial cells from BRCA mutation carriers and control patients predict ovarian cancer survival and disease progression. *Oncogene*, 2007;26(2):198–214.
- 21) Nodin B, Zendehrokh N, Brändstedt J, Nilsson E, Manjer J, Brennan DJ, et al. Increased androgen receptor expression in serous carcinoma of the ovary is associated with an improved survival. *J Ovarian Res*. 2010 Jun;17:3–14.

Table 1. Key clinical features and tumor characteristics of patients with EOC

Characteristic	N (Total cases = 152)	(%)
Age (mean (sd))	55.2	(12.3)
BMI (mean(sd))	27.2	(6.1)
Stage		
I	56	(36.8)
II	11	(7.2)
III	76	(50.0)
IV	9	(6.0)
Histology		
Serous	67	(44.1)
Mucinous	35	(23.0)
Endometrioid	14	(9.2)
Mixed	14	(9.2)
Undifferentiated	13	(8.5)
Clear cell	8	(5.3)
Carcinosarcoma	1	(1)
Steroid receptor status		
ER α	71	(46.7)
ER β	145	(95.4)
PR	48	(31.6)
AR	10	(6.5)
HER2	19	(12.5)
TNEOC*	60	(39.5)

ER = estrogen receptor (alpha or beta); PR = progesterone receptor; AR = androgen receptor

*TNEOC= triple-negative epithelial ovarian cancer; = tumors negative for ER α , PR and HER2

Table 2. Statistical analysis of associations between key molecular markers and clinicopathological features of EOC

Characteristic	Total n	ER- α n (%)	p*	ER- β n (%)	p*	PR n (%)	p*	AR n (%)	p*	HER2 n (%)	p*	TNEOC n (%)	p*
Age													
<50 years	47	15 (31.0)		44 (93.6)		15 (31.9)		9 (19.1)		4 (8.5)		22 (46.8)	
$\geq$ 50 years	103	54 (52.4)	0.46	99 (96.1)	0.73	32 (31.0)	0.91	13 (12.6)	0.51	15 (14.5)	0.95	38 (36.8)	0.80
Unknown	2												
Menopause													
Pre	42	13 (30.9)		39 (92.8)		13 (30.9)		6 (14.2)		5 (11.9)		19 (45.2)	
Post	107	56 (52.3)	0.82	10 (9.3)	0.86	34 (31.7)	0.79	16 (14.9)	0.95	14 (13.0)	0.86	40 (37.3)	0.76
Unknown	3												
BMI													
<25	42	20 (47.6)		41 (97.6)		6 (14.2)		7 (16.6)		3 (7.1)		18 (42.8)	
$\geq$ 25	65	32 (49.2)	0.66	63 (96.9)	0.85	25 (38.4)	<0.01	9 (13.8)	0.88	11 (16.9)	0.08	25 (38.4)	0.36
Unknown	45												
Histology													
Non-serous	77	26 (33.7)		73 (94.8)		22 (28.5)		6 (7.7)		13 (16.8)		37 (48.0)	
Serous	75	45 (60.0)	0.30	72 (96.0)	0.51	26 (34.6)	0.44	17 (22.6)	0.01	6 (8.0)	0.19	23 (30.6)	0.70
Unknown	0												
Grade													
I	37	6 (16.2)		36 (97.2)		7 (18.9)		6 (16.2)		2 (5.4)		27 (72.9)	
II-III	109	62 (56.8)	0.01	10 (9.1)	0.30	37 (33.9)	0.50	17 (15.5)	0.20	16 (14.6)	0.02	32 (29.3)	<0.01
Unknown	6												
Stage													
I	56	15 (26.7)		55 (98.2)		13 (23.2)		8 (14.2)		10 (17.8)		32 (57.1)	
II-IV	96	56 (58.3)	0.28	90 (93.7)	0.99	35 (36.4)	0.78	15 (15.6)	0.99	9 (9.3)	0.26	28 (29.1)	0.71
Unknown	0												
Residual disease													
No	94	37 (39.3)		90 (95.7)		28 (29.7)		14 (14.8)		14 (14.8)		42 (44.6)	
Yes	57	34 (59.6)	0.81	54 (94.7)	0.83	20 (35.0)	0.30	9 (15.7)	0.89	5 (8.7)	0.24	17 (29.8)	0.67
Unknown	1												

*p values adjusted using multivariate logistic regression models; values less than 0.05 are designated in bold font.

ER = estrogen receptor (alpha or beta); PR = progesterone receptor; AR = androgen receptor; TNEOC = triple negative ovarian cancer

Table 3. Disease-free survival as related to clinical factors and receptor status

	Disease-free survival		Disease-free survival (Individualized steroid receptor statuses were not used in this model)	
	RR	(95% CI)	RR	(95% CI)
Age				
<50 years	Ref		Ref	
≥50 years	0.50	(0.13 to 1.82)	0.46	(0.14 to 1.44)
Menopause				
Pre	Ref		Ref	
Post	4.40	(1.01 to 19.02)	3.44	(1.01 to 11.78)
BMI				
<25	Ref		Ref	
≥25	1.92	(0.87 to 4.25)	2.19	(1.03 to 4.65)
Histology				
Non-serous	Ref		Ref	
Serous	0.49	(0.21 to 1.13)	0.45	(0.20 to 1.001)
Grade				
I	Ref		Ref	
II-III	8.43	(1.67 to 42.62)	4.89	(1.21 to 19.7)
Stage				
I	Ref		Ref	
II-IV	2.63	(1.82 to 8.42)	3.14	(1.03 to 9.58)
Residual disease				
No	Ref		Ref	
Yes	2.18	(0.98 to 4.85)	1.69	(0.80 to 3.55)
ERα				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	0.39	(0.17 to 0.90)	–	(– to –)
ERβ				
Negative	Ref			
Positive	0.21	(0.03 to 1.43)		(– to –)
PR				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	1.96	(0.83 to 4.58)	–	(– to –)
AR				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	1.81	(0.49 to 6.56)	–	(– to –)
HER2				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	1.57	(0.39 to 6.22)	–	(– to –)
TNEOC				
Negative			Ref	
Positive	–	(– to –)	1.35	(0.62 to 2.9)

RR = risk ratio; 95%CI = 95% confidence intervals; ER = estrogen receptor (alpha or beta); PR = progesterone receptor; AR = androgen receptor; TNEOC = triple negative ovarian cancer

Table 4. Overall survival as related to clinical factors and receptor status

	Overall survival		Overall survival (Individualized steroid receptor statuses were not used in this model)	
	RR	(95% CI)	RR	(95% CI)
Age				
<50 years	Ref		Ref	
≥50 years	0.52	(0.15 to 1.77)	0.46	(0.15 to 1.37)
Menopause				
Pre	Ref		Ref	
Post	3.11	(0.81 to 11.85)	2.53	(0.83 to 7.71)
BMI				
<25	Ref		Ref	
≥25	1.99	(0.93 to 4.27)	2.32	(1.12 to 4.8)
Histology				
Non-serous	Ref		Ref	
Serous	0.56	(0.26 to 1.22)	0.54	(0.26 to 1.13)
Grade				
I	Ref		Ref	
II-III	4.03	(1.07 to 15.10)	3.24	(0.91 to 11.5)
Stage				
I			Ref	
II-IV	3.45	(1.10 to 10.85)	3.61	(1.2 to 10.8)
Residual disease				
No	Ref		Ref	
Yes	1.82	(0.86 to 3.87)	1.54	(0.77 to 3.2)
ERα				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	0.45	(0.20 to 1.00)	–	(– to –)
ERβ				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	0.50	(0.09 to 2.64)	–	(– to –)
PR				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	1.96	(0.91 to 4.25)	–	(– to –)
AR				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	1.87	(0.6 to 5.8)	–	(– to –)
HER2				
Negative	Ref		–	(– to –)
Positive	1.46	(0.42 to 5.04)	–	(– to –)
TNEOC				
Negative			Ref	
Positive	–	(– to –)	1.35	(0.62 to 2.9)

RR = risk ratio; 95% CI = 95% confidence intervals; ER = estrogen receptor (alpha or beta); PR = progesterone receptor; AR = androgen receptor; TNEOC = triple negative ovarian cancer

4. Conclusões

- Na avaliação isolada dos receptores, a expressão de receptor de estrógeno alfa foi de 46.7% e a de receptor de estrógeno beta foi de 95.4%. A expressão do receptor de progesterona foi de 31.6% e a de HER2 foi de 12.5%. Os tumores que expressaram receptor de andrógeno representaram 6.5% da amostra. Os tumores “triplo negativo” representaram 39,5% da amostra.
- O receptor de estrógeno beta não esteve associado significativamente a nenhum critério clínico-patológico. O estrógeno alfa esteve associado à idade > 50 anos, a ser menopausada, ao subtipo de tumor de ovário seroso, ao maior grau histológico de doença, ao maior estadiamento da FIGO e a ausência de doença residual > 1 cm. O receptor de andrógeno esteve mais presente no subtipo seroso. O receptor de progesterona esteve pouco presente na amostragem deste estudo e esteve relacionado ao IMC maior que 25. O HER2 é significativamente mais presente nos tumores de células claras e serosos. A subclasse de tumores de ovário triplo negativo esteve significativamente associada a tumores de grau histológico menos diferenciado.

- Na análise multivariada, estiveram associados com maior risco de recidiva ser menopausada à época do diagnóstico, apresentar doença com alto grau histológico, estágios avançados e apresentar IMC>25kg/m². Quanto à análise dos receptores e risco de recidiva, apenas o receptor de estrógeno alfa esteve significativamente associado ao maior intervalo livre de doença. Nas análises de sobrevida global, tiveram efeito positivo, apresentar doença em estágio inicial e ter IMC<25. Não houve associação da expressão dos receptores nem do grupo TNEOC com sobrevida global.

5. Referências Bibliográficas

1. Halon A, Materna V, Drag-Zalesinska M, Novak-Markwitz E, Gansukh T, Donizy P et al. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival. *Pathol Oncol Res* 2011; 17 (3): 511-518
2. GLOBOCAN 2008. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. <http://globocan.iarc.fr/>
3. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro; Inca 2011:118. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
4. Serov, SF, Scully RE, Sobin LH. International histological classification and staging of tumors, in *Histologic Typing of Ovarian Tumors*. World Health Organization: Geneva 1973.
5. Scully RE. Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 23: 208-218.
6. Rao BR, Slotman BJ. Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocr Rev* 1991; 12 (1):14–26.

7. Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. In: Atlas of tumor pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC 1998; 3rd series, fasc 23.
8. Pils D, Hager G, Tong D, Aust S, Heinze G, Kohl M et al. Validating the impact of a molecular subtype in ovarian cancer on outcomes: A study of the OVCAD Consortium. *Cancer Sci.* 2012; 103 (7): 1334-1341.
9. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30 (21): 2615-2623.
10. Hunn J, Rodriguez, GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55 (1): 3-23.
11. Brewer MA, Johnson K, Follen M, Gershenson D, Bast R Jr. Prevention of ovarian cancer: intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (1): 20-30.
12. Koch M, Gaedke H, Jenkins H. Family history of ovarian cancer patients: a case-controlled study. *Int J Epidemiol* 1989; 18 (4):782-785.
13. Sogaard M, Kjaer SK, Gayther S. Ovarian cancer and genetic susceptibility in relation to BRCA1 and BRCA2 genes. Occurrence, clinical importance and intervention. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 85 (1): 93-105.
14. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, Matsuno RK, Carney ME, Goodman MT. Symptom presentation in invasive ovarian carcinoma by tumor histological type and grade in a multiethnic population: a case analysis. *Gynecol Oncol.* 2010; 119(2): 278-284.
15. Liu N, Wang X, Sheng X. 'Triple negative' epithelial ovarian cancer and pathologic markers for prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011; 23 (1): 19-23.

16. Giles JR, Elkin RG, Trevino LS, Urick ME, Ramachandran R, Johnson, PA. The restricted ovulator chicken. A unique animal model for investigating the etiology of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20 (5): 738-744.
17. Rodriguez GC, Nagarsheth NP, Lee KL, Bentley RC, Walmer DK, Cline M et al. Progesterin induced apoptosis in the macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (1): 50-60.
18. Plaxe SC, Deligdisch L, Dottino PR, Cohen CJ. Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990; 38 (3): 367-372.
19. Fathalla, MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971 ; 2(7716) : 163.
20. Schildkraut JM, Bastos E, Berchuck A. Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p 53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 932-938.
21. Hakim AA, Barry CP, Barnes HJ, Anderson KE, Petitte J, Whitaker R et al. Ovarian adenocarcinomas in the laying hen & women have similar alterations in p53, ras & HER-2/neu. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2 (2): 114-121.
22. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 717-721.
23. Risch HA. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1774-1786.
24. Shan W, Liu J. Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. *Cell Cycle* 2009; 8 (19): 3107-3111.

25. Palmer DC, Muir IM, Alexander AI, Cauchi M, Bennett RC, Quinn MA. The prognostic importance of steroid receptors in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1988; 72: 388-393.
26. Geisler JP, Wiemann MC, Miller GA, Geisler HE. Estrogen and progesterone receptor status as prognostic indicators in patients with optimally cytoreduced stage IIIc serous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 1996; 60 (3):424–427.
27. Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997; 17(1B):613–619.
28. Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, Khunnarong J, Jesadapatarakul S, Tanwanich S. Expressions of estrogen and progesterone receptors in epithelial ovarian cancer . A clinicopathologic study. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19 (4): 620-627.
29. Pertschuk LP, Masood S, Simone J, Feldman JG, Fruchter RG, Axiotis CA et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in endometrial carcinoma: a prognostic marker for survival. *Gynecol Oncol* 1996; 63 (1): 28-33.
30. Canman CE, Chen C-Y, Lee MH, Kastan MB. DNA Damage responses: p53 induction, cell cycle perturbations and apoptosis. Woodbury, NY: Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994; 277-286.
31. Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev* 2007 ; 28(4): 440-461.
32. Hecht J, Kotsopoulos J, Hankinson SE, Tworeger SS. Relationship between epidemiological risk factors and hormone receptor expression in ovarian cancer: results from the Nurses'Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(5): 1624-1630.

33. Hoekstra A, Rodriguez GC. Chemoprevention of ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 2009; 149: 3-34.
34. Kommoss F, Pfisterer J, Geyer H, Thome M, Sauerbrei W, Pfleiderer A. Estrogen and progesterone receptors in ovarian neoplasms: discrepant results of immunohistochemical and biochemical methods. *Int J Gynecol Cancer* 1991; 1:147-153.
35. Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81:228-32
36. Shimizu M, Toki T, Takagi Y, Konishi I, Fujii S. Immunohistochemical detection of the Wilms' tumor gene (WT1) in epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 158–163.
37. Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:136–140.
38. Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor supressor involved in ovarian carcionogenesis. *Cancer Lett* 2006; 231:151-157
39. Cunat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 25-32.
40. Haring J, Schuler S, Lattrich C, Ortmann O, Treeck O. Role of estrogen receptor β in gynecological cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 127 (3): 673-676.
41. Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S et al. Loss of estrgen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 2365-2372.

42. De Stefano I, Zannoni GF, Prisco MG, Fagotti A, Tortorella L, Vizzielli G et al. Cytoplasmatic expression of estrogen receptor beta (ER β) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011; 122:573-579.
43. Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004; 159: 319- 335.
44. Akahira J, Suzuki T, Ito K, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T et al. Differential expression of progesterone receptor isoforms a and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:807-815.
45. Langdon SP, Gabra H, Bartlett JMS, Rabiaz GJ, Hawkins RA, Tesdale AL et al. Functionality of the progesterone receptor in ovarian cancer and its regulation by estrogen. *Clin Can Res* 1998; 4 (9): 2245-2251.
46. Ho S. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 1: 73.
47. Olsen CM, Green AC, Nagle CM, Jordan SJ, Whiteman DC, Bain CJ et al. Epithelial ovarian cancer: testing the “androgen hypothesis”. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15 (4): 1061-1068.
48. Greer JB, Modugno F, Allen GO, Ness RB. Androgenic progestins in oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2005; 105 (4): 731-740
49. Nodin B, Zendeirokh N, Brandstedt J, Nilsson E, Manjer J, Brennan DJ et al. Increased androgen receptor expression in serous carcinoma of the ovary is associated with an improved survival. *J Ovarian Res* 2010; 3: 14

50. Ludwig AH, Murawska M, Panek G, Timorek A, Kupryjanczyk J et al. Androgen, progesterone and FSH receptor polymorphisms in ovarian cancer risk and outcome. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16 (3): 1005-1016.
51. Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005; 23 (5): 391-409.
52. Lin CK, Lin WL, Chen FL, Lee MY, Kuo JF, Ruan A et al. Assessing the impact of polysomy-17 on HER2 status and the correlations of HER2 status with prognostic variables (ER, PR, p53, Ki-67) in epithelial ovarian cancer: a tissue microarray study using immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30(4): 372-379.
53. Hellstrom I, Goodman G, Pullman J, Yang Y, Hellstrom KE. Overexpression of HER2 in ovarian carcinomas. *Cancer* 2001; 61: 2420-2423.
54. Hodgall EV, Christensen L, Hodgall CK, Blaakaer J, Gayther S, Jacobs IJ et al. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor tumor expression in Danish ovarian cancer patients: from the "Malova" ovarian cancer study. *Oncol Rep.* 2007; 18 (5): 1051-1059.
55. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; 50 (13): 4087-4091.
56. Liu N, Wang X, Sheng X. The clinicopathological characteristics of 'triple negative' epithelial ovarian. *J Clin Pathol* 2010; 63 (3): 240-243.
57. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52:108-118.