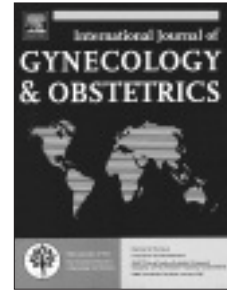


Marker tumorali nel carcinoma ovarico

M.R. RASPOLLINI, G.L. TADDEI



TUMOR MARKERS IN OVARIAN CARCINOMA

M.R. Raspollini, G.L. Taddei

Department of Human Pathology and Oncology, University of Florence, School of Medicine, Florence, Italy

Int. J. of Gynecol. and Obstet. 97: 175-181, 2007
0020-7292/\$ - see front matter

© 2007 International Federation of Gynecology and Obstetrics

RIASSUNTO

Questa rassegna analizza in due modi il valore diagnostico dei marker riscontrati nei carcinomi ovarici prima della chemioterapia. È noto che neoangiogenesi, attività ciclo-ossigenasica e responsività dell'ospite alla chemioterapia possono essere valutate per mezzo di molecole specificamente riconosciute come marker tumorali. Tuttavia, nella scelta di un trattamento occorre tener conto anche della risposta dell'ospite, nonché dell'istotipo, del grado di differenziazione e delle caratteristiche cliniche e istopatologiche. L'analisi deve quindi concentrarsi su basi molecolari della malattia aggressiva, peculiarità del tumore, efficacia della chemioterapia, e risposta dell'ospite alla neoplasia. Sebbene il trattamento possa essere più aggressivo nelle pazienti con elementi prognostici sfavorevoli, esso può essere modulato a seconda della biologia molecolare e cellulare del tumore e della risposta dell'ospite. Quando la caratterizzazione molecolare del tumore contribuisce alla scelta del trattamento, i marker prognostici possono trasformarsi in marker predittivi.

Introduzione

Modificazioni quantitative e/o qualitative dell'espressione genica possono spiegare la produzione di certe molecole nei tumori. Queste molecole sono utili marker di neoplasia nella pratica clinica e nella diagnosi di malattia, e anche durante il follow-up quali indicatori di recidiva. Inoltre, l'identificazione di tali marker in campioni biotici può aiutare a determinare l'istogenesi dei tumori ed a fornire informazioni prognostiche e predittive riguardo alla biologia del tumore.

Nelle neoplasie ovariche, i fattori prognostici meglio conosciuti sono l'istotipo, il grado di differenzia-

zione, e la malattia residua dopo trattamento chirurgico.

Di fronte a un tumore ovarico, l'anatomopatologo deve innanzitutto determinare se la neoplasia maligna è primaria o metastatica (1); nel primo caso, deve poi stabilire l'istogenesi del tumore (2). I tumori ovarici epiteliali primari sono stati associati a differenti prognosi, e il loro trattamento è diverso da quello non soltanto delle neoplasie metastatiche, ma anche dei tumori ovarici stromali e/o germinali. Negli ultimi anni, la disponibilità di specifici anticorpi monoclonali ha facilitato l'identificazione di prodotti cellulari o di marker di superficie. Attualmente disponiamo di un gruppo di marker immunoistochimici che, insieme alla valutazione macroscopica e microscopica del tumore, possono aiutare a definire esattamente il fenotipo di una lesione. Tutte queste caratteristiche (immunoistochimica ed esami macro- e microscopico) permettono

di distinguere tra lesioni ovariche primarie e metastatiche e, tra le prime, di differenziare quelle epiteliali dalle germinali e/o stromali.

È ben noto che l'accurata caratterizzazione istopatologica di un tumore, con una rigorosa stadiazione clinica e istopatologica, non sempre permette di formulare una chiara prognosi. Infatti, sebbene i carcinomi ovarici avanzati si associno in genere a una prognosi sfavorevole, si può rilevare in essi una considerevole diversità di comportamento, e alcune pazienti hanno una sopravvivenza eccezionalmente lunga (3). L'osservazione di differenti comportamenti biologici tra carcinomi ovarici dello stesso stadio clinico e anatomopatologico ha stimolato lo studio di marker in campioni di tumori, nella speranza che essi potessero spiegare queste differenze.

Quali sono i compiti dell'anatomopatologo che ha risolto tutti i complessi problemi diagnostici differenziali? Quali informazioni occorre fornire al clinico? E, oltre alla diagnosi di istotipo, quali altri dati possono eventualmente influenzare il trattamento terapeutico delle pazienti con carcinomi ovarici?

Scopo della presente rassegna è quello di analizzare il valore prognostico dei marker di carcinoma ovarico studiati su un campione del tumore prima della chemioterapia, poiché questi marker possono fornire informazioni riguardo al comportamento della neoplasia.

Analisi della letteratura

Sebbene il cancro dell'ovaio sia chemiosensibile, casi con caratteristiche cliniche e istopatologiche analoghe non rispondono necessariamente nella stessa maniera a un certo trattamento. Attualmente, nei carcinomi ovarici sia iniziali che avanzati viene usata la chemioterapia di combinazione (4). Recentemente, nuovi obiettivi terapeutici sono stati raggiunti con terapie più aggressive (ad esempio, aggiungendo un terzo farmaco al trattamento di prima linea) o con terapie di consolidamento (in cui un unico farmaco viene impiegato dopo 6 cicli di chemioterapia di combinazione) (5,6). Tuttavia, non sono stati stabiliti criteri di selezione delle pazienti che potrebbero trarre beneficio da una chemioterapia più aggressiva. Pertanto, insieme alla introduzione di nuove strategie terapeutiche, la ricerca di nuovi marker prognostici può contribuire alla scelta delle pazienti per una migliore personalizzazione della terapia – sia che i loro cancri siano in uno stadio iniziale o avanzato.

Una ricerca della letteratura recente in lingua inglese, in cui sono stati combinati termini quali "carcinoma ovarico" e "fattori prognostici", ha prodotto oltre 1.000 citazioni. Questo numero apparentemente non

è correlato a quello dei fattori prognostici che sono utilizzati nel trattamento clinico delle pazienti con cancro dell'ovaio. Questa osservazione è degna di nota, poiché può indicare che i fattori prognostici proposti hanno un valore clinico o biologico incerto.

Per la caratterizzazione di un carcinoma ovarico vanno presi in considerazione contemporaneamente differenti aspetti: da un lato la biologia intrinseca del tumore (cioè, l'istotipo e le caratteristiche molecolari che possono causare un fenotipo aggressivo o influenzare i risultati della terapia), dall'altro la risposta dell'ospite.

Non è quindi concepibile che un unico marker sia capace di fornire informazioni prognostiche sufficienti per adattare il trattamento alla paziente, mentre più elementi possono essere utili per la valutazione dei risultati clinici e la personalizzazione della terapia.

Neoangiogenesi

Uno dei fattori prognostici maggiormente studiati è l'angiogenesi. Le cellule tumorali secernono dei modulatori che danno inizio al processo angiogenico, la cui importanza è stata messa in rapporto con la progressione del tumore e con una prognosi sfavorevole (7-9). Per la prognosi di numerosi tumori solidi, tra cui il carcinoma ovarico, sono state usate le applicazioni cliniche della ricerca sull'angiogenesi, la quantificazione della vascolarizzazione delle neoplasie primarie per mezzo di marcatori specifici delle cellule endoteliali, e la valutazione della densità dei microvasi tumorali (MVD, *Micro Vessel Density*) (10). Le pareti vasali nel tessuto incluso in paraffina possono essere identificate mediante colorazioni immunoistochimiche specifiche delle cellule endoteliali, quali CD34 (Fig. 1). Dopo colorazione, i vetrini possono essere esaminati a basso ingrandimento per identificare le aree del tumore con

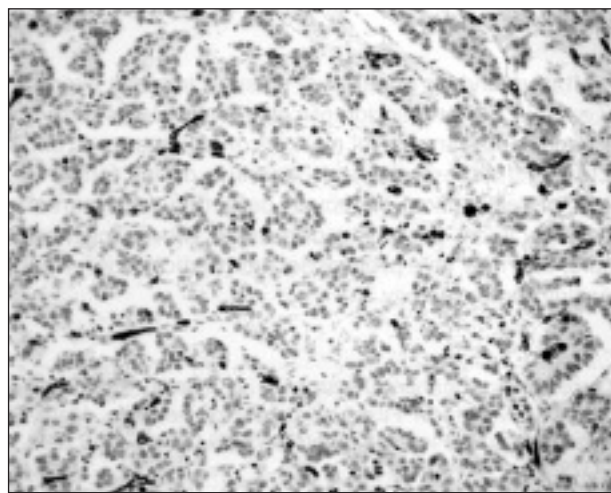


Fig. 1 - Le pareti vasali e le singole cellule endoteliali sono colorate da un marker specifico (come CD34) nel tessuto incluso in paraffina di un carcinoma sieroso ovarico.

la maggiore densità di microvasi. In tali aree, i microvasi vengono poi contati a più alto ingrandimento. Usando questo metodo, una correlazione significativa è stata evidenziata tra MVD ed esito clinico.

Inoltre, studi recenti hanno sottolineato che quando si valuta il ruolo clinicopatologico dell'angiogenesi occorre sempre tener conto del tipo istologico del tumore. Ad esempio, il raro carcinoma ovarico a cellule chiare è caratterizzato da un'alta MVD, e rispetto agli altri tipi ha una prognosi peggiore (11). Una considerazione analoga è stata fatta per quanto riguarda i tumori ovarici mucinosi (12). Differenti profili genetici sono stati descritti per i tumori ovarici mucinosi e sierosi. Ad esempio, è stato dimostrato che la mutazione dell'oncogene *K-ras*, frequentemente osservata nei tumori mucinosi (13), up-regola l'espressione del fattore di crescita dell'endotelio vasale (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), un fattore angiogenico (14), mentre la mutazione del gene soppressore tumorale *p53*, frequentemente osservata nei tumori ovarici sierosi (15), è stata messa in relazione con l'inibitore dell'angiogenesi trombospondina 1 (16). I differenti profili genetici possono spiegare le diverse vie angiogeniche, poiché l'aumentata MVD nel carcinoma ovarico mucinoso è probabilmente in relazione con le più voluminose masse tumorali osservate in questo tipo di cancro.

L'importanza dello sviluppo di nuovi vasi per la crescita del tumore e le metastasi ha portato alla creazione di strumenti capaci di minare o bloccare questo processo (17). Gli inibitori dell'angiogenesi hanno dimostrato di possedere attività antineoplastica in modelli sperimentali, e molti di questi composti sono nella fase studi clinici (18, 19). I risultati ottenuti dagli Autori della presente rassegna (20) indicano anche che l'entità della neovascolarizzazione può avere significato prognostico nelle pazienti con carcinoma ovarico sieroso in stadio avanzato, in quanto è statisticamente correlata sia alla sopravvivenza che alla responsività clinica alla chemioterapia di prima linea. Il grado di angiogenesi dovrebbe permettere di identificare pazienti che sono ad alto rischio di recidiva, e che possono trarre doppiamente vantaggio da terapie adiuvanti aggressive, perché alcuni dei farmaci impiegati in questo ambito hanno anche attività antiangiogenica (21-23).

Tra i marker di neoangiogenesi, il VEGF, del peso molecolare di 32-42 kDa, è una glicoproteina omodimerica legante l'eparina, che *in vitro* stimola fortemente la proliferazione delle cellule endoteliali e *in vivo* ha un'attività angiogenica (24). Numerosi studi ne hanno definito il ruolo nell'angiogenesi tumorale (25). L'mRNA del VEGF è espresso nella grande maggioranza dei tumori umani, incluso il carcinoma ovarico (26, 27). Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione significativa tra espressione del VEGF (Fig.

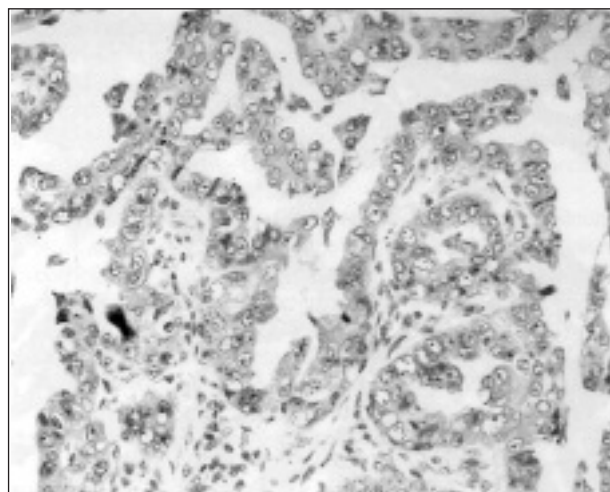


Fig. 2 - Tessuto di carcinoma sieroso ovarico incluso in paraffina, che mostra la colorazione immunohistochimica positiva di un anticorpo policlonale anti-VEGF nella membrana cellulare e nel citoplasma.

2) e MVD nelle masse tumorali (28). Negli studi immunohistochimici, si è visto che nelle pazienti con cancro dell'ovaio l'espressione di VEGF è un fattore prognostico (29). Inoltre, in pazienti con carcinoma ovarico in stadio avanzato si è visto che una elevata espressione di VEGF più un'alta MVD determinano una prognosi peggiore rispetto alla assenza di espressione di VEGF e a una bassa MVD (30). L'osservazione che l'inibizione del VEGF sopprime l'angiogenesi patologica ha portato allo sviluppo sperimentale di vari inibitori di questo fattore. Tuttavia, la reale influenza della inibizione del VEGF nei pazienti con cancro richiede ulteriori studi.

Ciclo-ossigenasi 2

Tra i fattori prognostici nelle pazienti con carcinoma ovarico, molti studi si sono concentrati sulla ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), la cui espressione è indotta da agenti quali citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e radiazione ultravioletta B (UVB) (31, 32). Nell'ultimo decennio, focalizzandosi soprattutto su modelli di tumore coloretale, la ricerca ha compiuto passi in avanti nella valutazione del ruolo della COX-2 nella cancerogenesi (33, 34) e a supporto dell'ipotesi che gli inibitori selettivi dell'enzima abbiano *in vivo* un potente effetto antineoplastico (35). La concentrazione della prostaglandina (PG)-E₂ (PG-E₂) è aumentata nelle cellule iperesprimenti COX-2, e ciò è considerato il più importante effetto a valle della COX-2. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra espressione di COX-2 e inibizione della morte cellulare programmata o apoptosi (36). Le dimensioni dei tumori dipendono dall'equilibrio tra proliferazione cellulare e morte cellulare. Nel cancro

l'apoptosi è ridotta, ma nel carcinoma del colon un suo incremento è stato riscontrato dopo introduzione di un inibitore selettivo della COX-2, e livelli aumentati della proteina antiapoptotica Bcl-2 sono stati osservati dopo esposizione *in vitro* a PGE₂ (37).

Dati recenti indicano anche un ruolo della COX-2 nel processo dell'angiogenesi. È stato dimostrato che l'iperespressione di COX-2 nelle cellule del carcinoma coloretale aumenta la produzione di VEGF, la migrazione delle cellule endoteliali attraverso una matrice di collagene, e la formazione di reti tubulari (38). Pertanto, COX-2 e PG possono svolgere un importante ruolo nello sviluppo dei tumori attraverso il meccanismo della neoangiogenesi e la stimolazione della crescita delle cellule neoplastiche. La COX-2 induce l'espressione di metalloproteinasi della matrice, una famiglia di enzimi che degrada la matrice, e attraverso questa azione può favorire le metastasi (39, 40). Inoltre, è stata osservata una associazione tra l'iperespressione di COX-2 e le proprietà di adesione delle cellule cancerose. L'E-caderina assicura l'adesione tra le cellule epiteliali; la COX-2, provocando una riduzione della sua espressione, permette alle cellule tumorali di aderire alla matrice extracellulare e alle cellule endoteliali (41).

Nelle neoplasie ovariche l'angiogenesi è strettamente correlata alla espressione della COX-2 (Fig. 3), e nelle pazienti in cui tale espressione e l'angiogenesi sono aumentate (42,43) la sopravvivenza è più bassa.

Responsività alla chemioterapia

La responsività alla chemioterapia è un potente fattore prognostico di esito clinico. Una significativa percentuale di pazienti con carcinoma ovarico avanzato

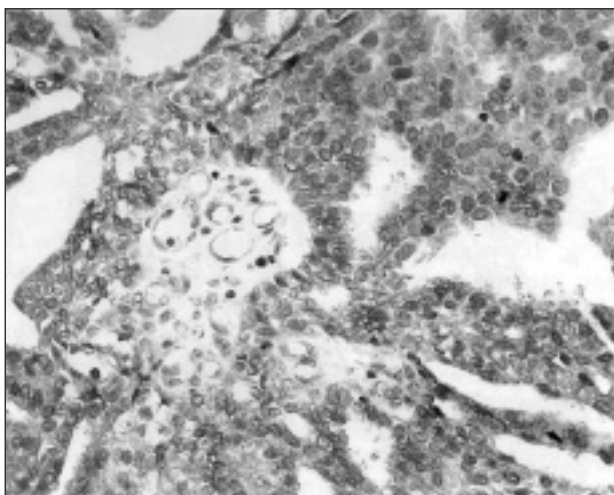


Fig. 3 - Tessuto di carcinoma sieroso ovarico incluso in paraffina, che mostra la colorazione immunostochimica positiva di un anticorpo policlonale anti-COX-2 nella membrana cellulare e nel citoplasma.

mostra resistenza alla chemioterapia di prima linea; e quelle responsive in prima linea possono sviluppare una resistenza ai farmaci chemioterapici, con insuccesso finale del trattamento. La resistenza alla chemioterapia è da mettere in relazione con diversi meccanismi (ad esempio, alterazioni nel trasporto dei farmaci; turnover cellulare dei farmaci; sistemi citoplasmatici di difesa; e sistemi molecolari di riparo del DNA). La comprensione dei meccanismi coinvolti costituisce un primo passo verso la personalizzazione delle terapie. Negli ultimi decenni, numerosi studi hanno sottolineato l'importanza del ruolo delle proteine trasportatrici, e i loro dati sono stati recentemente confermati con tecnologie più moderne (44). È ben noto che le pompe proteiche che mediano l'efflusso dei farmaci possono avere un ruolo importante nella farmacoresistenza, impedendo l'accumulo degli agenti terapeutici nelle cellule tumorali. La proteina MDR-1 (*MultiDrug Resistance-1*) o glicoproteina P, una proteina di 170 kDa codificata dal gene umano *mdr1* situato sulla regione cromosomica 7q21, è una delle proteine più importanti coinvolte nella resistenza ai farmaci (45). Localizzata nella membrana cellulare, essa trasporta farmaci citotossici come il paclitaxel e il taolo dall'ambiente intracellulare a quello extracellulare (46, 47). Si è visto che nelle pazienti con carcinoma ovarico una aumentata espressione di MDR-1 si associa a una peggiore prognosi (48, 49). Altri studi hanno messo in rilievo il ruolo svolto dalla proteina p53 di tipo selvaggio nella risposta cellulare ai farmaci citotossici. Questo prodotto genico agisce modificando la regolazione del ciclo cellulare e il riparo del DNA, e provoca apoptosi attraverso l'attivazione di tali vie (50). Ulteriori studi hanno descritto che alterazioni nel sistema di riparo dei difetti di appaiamento delle basi azotate del DNA (MMR, *MisMatch Repair*), che vengono valutate con l'analisi dell'instabilità dei microsattelliti, possono avere quale risultato una farmacoresistenza (51, 52).

Un altro elemento può creare difficoltà nel trattamento delle pazienti con carcinoma ovarico. Tra i carcinomi epiteliali dell'ovaio, i differenti istotipi (cioè, i carcinomi sierosi, mucinosi, endometrioidi, a cellule chiare, e a cellule transizionali) hanno una diversa chemiosensibilità nei confronti degli stessi farmaci (53-55). Di conseguenza, la caratterizzazione molecolare del tumore, associata al corretto riconoscimento dell'istotipo prima di una qualsiasi chemioterapia, può portare alla identificazione di espressioni geniche in rapporto con la chemioresistenza, come quella della glicoproteina P (56). Essa può anche portare a identificare una mutazione del gene *p53* (57) e/o di altri geni implicati nello sviluppo di una resistenza clinica ai farmaci (58), permettendo quindi un trattamento più personalizzato nelle singole pazienti.

Risposta dell'ospite al tumore

Non solo le caratteristiche molecolari del tumore, ma anche la risposta della paziente, può contribuire a una più breve o più lunga sopravvivenza. È noto che l'effetto del sistema immunitario sulla progressione del tumore può svolgere un ruolo importante per quanto riguarda l'esito clinico. Gli immunologi hanno avanzato l'ipotesi che il sistema immunitario possa eliminare le neoplasie allo stadio iniziale e permettere la progressione di altri tumori. Un'osservazione che avvalorava questa ipotesi è che nei pazienti trattati con farmaci immunosoppressori la prevalenza di neoplasie è più elevata che nelle popolazioni di controllo (59). Vi sono anche prove sperimentali indicative di un coinvolgimento del sistema immunitario nell'esito clinico, poiché, nelle pazienti con carcinomi ovarici sierosi le cellule T che infiltrano i tumori CD3+ si associano ad un intervallo libero da malattia più lungo, e ad una maggiore responsività clinica alla chemioterapia (60, 61). Anche la ciclo-ossigenasi 2 è coinvolta nella risposta immune dell'ospite, come documentato da evidenze sperimentali. L'infiltrazione della neoplasia da parte di cellule linfocitarie è stata dimostrata in pazienti trattati con inibitori della COX-2, con successiva riduzione della massa tumorale (62).

Commenti

L'osservazione di un diverso comportamento biologico nelle pazienti con carcinoma ovarico agli stessi stadi FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*), malattia residua dopo l'intervento chirurgico, tipo istologico e grado di differenziazione, ha stimolato lo studio di fattori prognostici che potessero spiegare queste differenze.

Negli ultimi anni, nuove tecnologie di biologia molecolare hanno fornito risultati promettenti per quanto riguarda gli eventi genomici utili ai fini della comprensione dell'eziologia e della progressione delle neoplasie maligne, dando nuove speranze anche per ciò che concerne il loro trattamento.

Con la migliore comprensione del meccanismo di azione dei differenti farmaci, e con i nuovi agenti antitumorali usati nella pratica clinica, la necessità di caratterizzare fattori prognostici e/o predittivi è diventata ancora più urgente. Eseguita dagli anatomopatologi su campioni di tessuto, questa caratterizzazione ha assunto la stessa importanza della determinazione dell'istotipo del tumore. È ora chiaro che la caratterizzazione dei fattori prognostici e/o predittivi guiderà la scelta dei farmaci per un trattamento personalizzato.

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno avuto per oggetto i marker molecolari delle neoplasie ovariche. Nella maggior parte di questi studi, tuttavia, non è sta-

ta eseguita una seria analisi comparativa dei fattori prognostici classici (quali tipo istologico, grado di differenziazione, stadio di malattia, trattamento, presenza di malattia residua, e nuovi marker molecolari). Pertanto, i geni o gruppi di geni identificati non sono stati sufficientemente validati, così da giustificarne l'impiego nella pratica clinica quali fattori prognostici o predittivi.

Con una migliore comprensione delle basi molecolari della cancerogenesi ovarica, sono stati introdotti nuovi trattamenti (63, 64); e alcuni di questi marcatori prognostici e/o predittivi di esito sfavorevole possono essere di aiuto nella scelta di questi trattamenti.

Attualmente, solo in pochissimi casi la conoscenza dei fattori prognostici può guidare il trattamento di una paziente con carcinoma ovarico. Sia nel carcinoma iniziale che in quello avanzato, il trattamento chemioterapico consiste il più delle volte nella combinazione di derivati del platino e taxani.

Numerosi sono i possibili fattori prognostici che sono stati studiati nel cancro dell'ovaio. Nella maggior parte degli studi è stato valutato un unico marker, e mai in relazione ad altri fattori che notoriamente influenzano il comportamento biologico. Poiché nella caratterizzazione di un singolo tumore può essere più utile un gruppo di marker molecolari, gli studi che ne analizzano l'espressione possono essere importanti per la scelta dei trattamenti. Prima del trattamento, per identificare marker biologici predittivi di sensibilità o di resistenza a un unico farmaco o di caratteristiche molecolari del carcinoma ovarico da trattare, possono essere impiegati campioni chirurgici.

Nelle pazienti con carcinoma ovarico avanzato, i marker prognostici di esito sfavorevole possono suggerire un trattamento più aggressivo o l'associazione con inibitori della COX-2 [quali descritti per altre neoplasie (65) e confermati in linee cellulari di cancro dell'ovaio (66)] o dell'angiogenesi.

Recentemente, nuove tecniche, quali i microarray di DNA e proteine, hanno reso possibili screening ad alte precisioni dei tumori. Tuttavia, nessuno dei marker molecolari mirati ha un ruolo clinicamente documentato nel carcinoma ovarico (67).

In particolare, l'applicazione dei microarray tessutali – che è stata ampiamente utilizzata nella ricerca oncologica per identificare la “firma” molecolare di significato diagnostico e/o prognostico (68-70) – può permettere studi sistematici e portare alla identificazione di biomarker nei carcinomi ovarici.

Negli anni a venire, un approccio multimodale potrà essere di aiuto nella selezione dei fattori prognostici. Tale approccio dovrebbe combinare chirurgia citoreducitiva, stadiazione della malattia, e valutazione biochimica dei marker sierici, nonché una caratterizzazione istopatologica di un campione del tumore più stret-

tamente in rapporto alla biologia e alla aggressività del singolo tumore. Guidando la scelta della chemioterapia e delle terapie adiuvanti, l'approccio multimodale dovrebbe migliorare l'esito clinico anche nelle pazienti con carcinoma ovarico.

Lo studio dei fattori prognostici (71) può aiutare anche a individualizzare i trattamenti nelle pazienti con carcinoma allo stadio iniziale.

Inoltre, ulteriori studi sulla biologia del tumore e la risposta dell'ospite potranno presto fornire la chiave per selezionare le pazienti suscettibili di trarre beneficio da una combinazione di chemioterapia e immunoterapia (72).

Le prospettive future possono seguire queste tappe:

1) analisi dei fattori prognostici biomolecolari su casistiche di pazienti con malattie singole;

2) caratterizzazione fenotipica dei singoli casi;

3) chemioterapia ritagliata sulle caratteristiche molecolari del singolo tumore.

I marcatori tumorali predittivi della risposta dell'ospite possono essere utili per personalizzare il trattamento. Un'analisi delle basi molecolari della malattia aggressiva dovrebbe essere incentrata sulle peculiarità della neoplasia, l'efficacia della chemioterapia, e la risposta dell'ospite al tumore. Di conseguenza, i trattamenti possono essere più aggressivi nelle pazienti con elementi indicativi di un esito sfavorevole, ma possono essere anche modulati a seconda della biologia molecolare e cellulare della malattia e della risposta dell'ospite. In tal modo, i marker biologici possono trasformarsi in marker predittivi, con la caratterizzazione molecolare che guida la scelta del trattamento.

Bibliografia

1. McCLUGGAGE WG, WILKINSON N. *Metastatic neoplasia involving the ovary: a review with an emphasis on morphological and immunohistochemical features*. *Histopathology* 2005;47(3): 231-47.
2. BAKER PM, OLIVA E. *Immunohistochemistry as a tool in the different diagnosis of ovarian tumors: an update*. *Int J Gynecol Pathol* 2005;24:39-55.
3. OZOL RF. *Ovarian cancer*. In: STEELE GD, PHILLIPS TL, CHABNER BA, editore. *Atlas of Clinical Oncology*. Hamilton: BC Decker Inc; 2003.
4. OZOL RF. *Update of the NCCN ovarian cancer practice guidelines*. *Oncology (Huntingt)* 1997;11:95-105.
5. COPELAND LJ, BOOKMAN M, TRIMBLE E. *Clinical trials of newer regimens for treating ovarian cancer: the rationale for Gynecologic Oncology Group Protocol GOG 182-ICON5*. *Gynecol Oncol* 2003;90:S1-7 (suppl).
6. STUART GC. *First-line treatment regimens and the role of consolidation therapy in advanced ovarian cancer*. *Gynecol Oncol* 2003;90:58-515 (suppl).
7. FOLKMAN J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
8. MACCHIARINI P, FONTANINI G, HARDIN MJ, SQUARTINI F, ANGELETTI CA. *Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer*. *Lancet* 1992;340:145-6.
9. GASPARINI G, WEIDNER N, MALUTA S, POZZA F, BORACCHI P, MEZZETTI M, et al. *Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer* 1993;55: 739-44.
10. WEIDNER N, SEMPLE JP, WELCH WR, FOLKMAN J. *Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma*. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
11. OGAWA S, KAKU T, KOBAYASHI H, HIRAKAWA T, OHISHI Y, KINUKAWA N, et al. *Prognostic significance of microvessel density, vascular cuffing and vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma: a special review for clear cell adenocarcinoma*. *Cancer Lett* 2002;176:111-8.
12. ORRE M, LOTFI-MIRI M, MAMERS P, ROGERS PA. *Increased microvessel density in mucinous compared with malignant serous and benign tumours of the ovary*. *Br J Cancer* 1998;77: 2204-9.
13. CUATRECASAS M, VILLANUEVA A, MATIAS-GULU X, PRAT J. *K-ras mutation in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases*. *Cancer* 1997;79: 1581-6.
14. RAK J, MITSUHASHI Y, BAYKO L, FILMUS J, SHIRASAWA S, SASAZUKI T, et al. *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*. *Cancer Res* 1995;55:4575-80.
15. SINGER G, KURMAN RJ, CHANG H-W, CHO SK, SHIHLE M. *Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma*. *Am J Pathol* 2002; 160:1223-8.
16. DAMERON KM, VOLPERT OV, TAINSKY MA, BOUCK N. *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin, 1*. *Science* 1994;265:1582-4.
17. CARMELIET P, JAIN RK. *Angiogenesis in cancer and other disease*. *Nature* 2000;407:249-57.
18. BROWER V. *Tumor angiogenesis-new drugs on the block*. *Nat Biotechnol* 1999;17:963-8.
19. TARABOLETTI G, MARGOSIO B. *Antiangiogenic and anti-vascular therapy for cancer*. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1: 378-84.
20. RASPOLLINI MR, AMUNNI G, VILLANUCCI A, BARONI G, BODDI V, TADDEI GL. *Prognostic significance of microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in advanced ovarian serous carcinoma*. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:815-23.
21. MILLER KD, SWEENEY CJ, SLEDGE GW. *Redefining the target: chemo-therapeutics as antiangiogenics*. *J Clin Oncol* 2001; 19:1195-206.
22. SCHIRNER M. *Antiangiogenic chemotherapeutic agente*. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:67-73.
23. TARABOLETTI G, MICHELETTI G, RIEPPI M, POLI M, TURATTO M, ROSSI C, et al. *Antiangiogenic and antitumor activity of IDN 5390, a new taxane derivative*. *Clin Cancer Res* 2002;8: 1182-8.
24. YANCOPOULOS GD, DAVIS S, GALE NW, RUDGE JS, WIEGAND SJ, HOLASH J. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. *Nature* 2000;407:242-8.
25. FERRARA N. *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.

26. SOWTER HM, CORPS AN, EVANS AL, CLARK DE, CHARNOCK-JONES DS, SMITH SK. *Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors*. Lab Invest 1997;77:607-14.
27. YAMAMOTO S, KONISHI I, MANDAI M, KURODA H, KOMATSU T, NANBU K, et al. *Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasm: correlation with clinicopathology and patients survival, and analysis of serum VEGF levels*. Br J Cancer 1997;76:1221-7.
28. FERRARA N. *Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects*. Curr Top Microbiol Immunol 1999;237:1-30.
29. SHEN GH, GHAZIZADEH M, KAWANAMI O, SHIMIZU H, JIN E, ARAKI T, et al. *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma*. Br J Cancer 2000;2:196-203.
30. RASPOLINI MR, AMUNNI G, VILLANUCCI A, BODDI V, BARONI G, TADDEI A, et al. *COX-2 status in relation to tumor microvessel density (MVD) and VEGF expression: analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival*. Oncol Rep 2004;11:309-13.
31. PEPPELENBOSCH MP, TERTOOLEN LG, HAGE WJ, DE LAAT SW. *Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products*. Cells 1993;74: 565-75.
32. CHEN CC, SUN YT, CHEN JJ, CHANG YJ. *Tumor necrosis factor α induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and IkappaB kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells*. Mol Pharmacol 2001;59:493-500.
33. OSHIMA M, DINCHUK JE, KARGMAN SL, OSHIMA H, HANCOCK B, KWONG E, et al. *Suppression of intestinal polyposis in APC delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2)*. Cell 1996;87: 803-9.
34. SONOSHITA M, TAKAKU K, SASAKI N, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F, NARUMIYA S, et al. *Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc (Delta716) knockout mice*. Nat Med 2001;7:1048-51.
35. GUPTA RA, DUBOIS RN. *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. Nat Rev Cancer 2001;1:11-21.
36. TSUJII M, DUBOIS RN. *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2*. Cell 1995;83:493-501.
37. SHENG H, SHAO J, MORROW JD, BEAUCHAMP RD, DUBOIS RN. *Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells*. Cancer Res 1998; 58:362-6.
38. TSUJII M, KAWANO S, TSUJI S, SAWAOKA H, HORI M, DUBOIS RN. *Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells*. Cell 1998;93:705-16.
39. TSUJII M, KAWANO S, DUBOIS RN. *Cyclooxygenase expression in human colon cancer cells increases metastatic potential*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:3336-40.
40. FERNANDEZ PM, MANYAK MJ, PATERNO SR. *Effect of the cyclooxygenase-2 selective inhibitor NS398 on the secretion of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1 TIMP-2) from human prostate tumor cells*. Proc Am Assoc Cancer Res 2000;41:131-2.
41. KAKIUCHI Y, TSUJII S, TSUJII M. *Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens in colon cancer cells and enhanced liver metastasis*. Cancer Res 2002;62:1567-72.
42. ALI-FEHMI R, MORRIS RT, BANDYOPADHYAY S, CHEM, SCHIMP V, MALONE JR JM, et al. *Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival*. Am J Obstet Gynecol 2005;192:819-25.
43. RASPOLINI MR, AMUNNI G, VILLANUCCI A, BODDI V, BARONI G, TADDEI A, et al. *Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome*. Gynecol Oncol 2004;92:806-12.
44. ZHANG T, GUAN M, JIN HY, LU Y. *Reversal of multidrug resistance by small interfering double-stranded RNAs in ovarian cancer cells*. Gynecol Oncol 2005;97:501-7.
45. BOSCH I, CROOP J. *P-glycoprotein multidrug resistance and cancer*. Biochim Biophys Acta 1996;1288:37-54.
46. NOOTER K, HERWEIJER H. *Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer*. Br J Cancer 1991;63:663-9.
47. KUWANO M, TOH S, UCHIUMI T, TAKANO H, KOHNO K, WADA M. *Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance*. Anticancer Drug Res 1999;14:123-31.
48. MATERNA V, PLEGER J, HOFFMANN U, LAGE H. *RNA expression of MDR1 /P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response*. Gynecol Oncol 2004;94:152-60.
49. PENSON RT, OLIVA E, SKATES SJ, GLYPTIS T, FULLER JR AF, GOODMAN A, et al. *Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples*. Gynecol Oncol 2004;93: 98-106.
50. HARRIS CC. *Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies*. J Natl Cancer Inst 1996;88:1442-55.
51. WEI SH, BROWN R, HUANG TH. *Aberrant DNA methylation in ovarian cancer: is a epigenetic predisposition to drug response?* Ann N Y Acad Sci 2003;983:243-50.
52. STRATHDEE G, MACKEAN M, ILLAND M, BROWN R. *A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer*. Oncogene 1999;18:2335-41.
53. ARAO S, SUWA H, MANDAI M, TASHIRO H, MIYAZAKI K, OKAMURA H, et al. *Expression of multidrug resistance gene and localization of P-glycoprotein in human primary ovarian cancer*. Cancer Res 1994;54:1355-9.
54. SWEETEN KM, GERSHENSON DM, BURKE TW, MORRIS M, LEVENBACK C, SILVA KG. *Salvage chemotherapy for refractory transitional cell carcinoma of the ovary (TCC)*. Gynecol Oncol 1995;59:211-5.
55. ITAMOCHI H, KIGAWA J, SUGIYAMA T, KIKUKI M, TERAKAWA N. *Low proliferation activity may be associated with chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary*. Obstet Gynecol 2002;100:281-7.
56. RASPOLINI MR, AMUNNI G, VILLANUCCI A, BODDI V, TADDEI GL. *Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170 (MDR1) expression are associated with chemotherapy resistance and poor prognosis: analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival*. Int J Gynecol Cancer 2005;15:255-60.
57. OGGIONNI M, PILOTTI S, SUARDI S, DITTO A, LUONICI C, MARIANI L, et al. *P53 gene status and response to topotecan-containing chemotherapy in advanced ovarian carcinoma*. Oncology 2005;69:154-8.
58. RICHARDSON A, KAYE SB. *Drug resistance in ovarian cancer: the emerging importance of gene transcription and spatiotemporal regulation of resistance*. Drug Resist Updat 2005;8:311-21.
59. DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H, OLD LJ, SCHREIBER RD. *Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol 2002;3:991-8.
60. ZHANG L, CONEJO-GARCIA JR, KATSAROS D, GIMOTTY PA, MASSOBRIO M, REGNANI G, et al. *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med 2003;348:203-13.

61. RASPOLLINI MR, CASTIGLIONE F, ROSSI DEGL'IN-
NOCENTI D, AMUNNI G, VILLANUCCI A, GARBINI F,
et al. *Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma.* Ann Oncol 2005;16: 590-6.
62. STOLINA M, SHARMA S, LIN Y, DOHADWALA M,
GARDNER B, LUO J, et al. *Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis.* J Immunol 2000;164:361-70.
63. JOENSUU H, ROBERTS PJ, SARLOMO-RIKALA M, ANDERSSON LC, TERVAHARTIALA P, TUVESON D, et al. *Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor.* N Engl J Med 2001;344:1052-6.
64. SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S, FUCHS H, PATON V, BAJAMONDE A, et al. *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.* N Engl J Med 2001;344:783-92.
65. SORIANO AF, HELFRICH B, CHAN DC, HEASLEY LE, BUNN JR PA, CHOU TC. *Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines.* Cancer Res 1999;59:6178-84.
66. MUNKARAH AR, GENHAI Z, MORRIS R, BAKER W, DEPPE G, DIAMOND MP, et al. *Inhibition of paclitaxel-induced apoptosis by the specific COX-2 inhibitor, NS398, in epithelial ovarian cancer cells.* Gynecol Oncol 2003;88(3): 429-33.
67. CRIJNS AP, DUIKER KW, DE JONG S, WILLEMSE PH, VAN DER ZEE AG, DE VRIES KG. *Molecular prognostic markers in ovarian cancer.* Int J Gynecol Cancer 2005;16(suppl 1):5152-65.
68. SALLINEN SL, SALLINEN PK, HAAPASALO HK, HELIN HJ, HELEN PT, SCHRAML P, et al. *Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques.* Cancer Res 2000;60(23):6617-22.
69. NOCITO A, BÜBENDORF L, TINNER EM, SUESS K, WAGNER U, FORSTER T, et al. *Microarray of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade.* J Pathol 2001; 194(3): 349-57.
70. FOWLER JM, RAMIREZ N, COHN DE, KELBICK N, PAVELKA J, BEN SHACHAR I, et al. *Correlation of endometrial cancer: tissue microarray analysis.* Am J Obstet Gynecol 2005;192(4): 1262-73.
71. TRIMBOS JB, PARMAR M, VERGOTE I, GUTHRIE D, BOLIS G, COLOMBO N, et al. *International collaborative ovarian neoplasm trial 1 and adjuvant chemotherapy in ovarian neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma.* J Natl Cancer Inst 2003;95:105-12.
72. BEREK JS. *Immunotherapy of ovarian cancer with antibodies: a focus on oregovomab.* Expert Opin Biol Ther 2004;4(7): 1159-65.